



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD  
ECOLOGÍA**

### **IMPACTOS COLATERALES DEL USO DE PLAGUICIDAS A LOS MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN AGROECOSISTEMAS**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MARÍA SEMIRAMIS GUTIÉRREZ NÚÑEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOHN LARSEN**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

**COMITÉ TUTOR: FELIPE FRANCISCO GARCÍA OLIVA**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

**ALEJANDRO ALARCÓN**

COLEGIO DE POSTGRADUADOS, MONTECILLO

**CD.MX. ENERO DE 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**

### **IMPACTOS COLATERALES DEL USO DE PLAGUICIDAS A LOS MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN AGROECOSISTEMAS**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MARÍA SEMIRAMIS GUTIÉRREZ NÚÑEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOHN LARSEN**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: FELIPE FRANCISCO GARCÍA OLIVA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM**

**ALEJANDRO ALARCÓN**

**COLEGIO DE POSTGRADUADOS, MONTECILLO**

**CD.MX. ENERO DE 2017**

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 octubre de 2016, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**, a la alumna **GUTIÉRREZ NÚÑEZ MARÍA SEMIRAMIS**, con número de cuenta 515015658, con la tesis titulada, "Impactos colaterales del uso de plaguicidas a los microorganismos promotores del crecimiento vegetal en agroecosistemas", bajo dirección del Dr. John Larsén:

Presidente: Dr. Erick de la Barrera Montpellier  
Vocal: Dra. Marta Astier Calderón.  
Secretario: Dr. Felipe Francisco García Oliva  
Suplente: Dr. Roberto Antonio Lindíg Cisneros  
Suplente: Dr. Bruno Manuel Chávez Vergara

Sin otro particular, quedo de usted.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mex., a 14 de noviembre de 2016



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por su apoyo académico y administrativo durante mi formación en la Maestría.

Al consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de este posgrado al otorgarme la beca número 385735 para el financiamiento de mis estudios de Posgrado. Así mismo, al programa de apoyo Becas Mixtas 2015- MZO2016 movilidad en el extranjero (290936).

A los apoyos a los estudios de Posgrado PAEP 2015 y 2016 de la UNAM.

A mi comité tutorial: Dr. John Larsen, Dr. Felipe García Oliva y Dr. Alejandro Alarcón, por su confianza y sus aportaciones durante la realización de la presente investigación.

Al Laboratorio de Agroecología, IIES, UNAM, por la atención y facilidades para realizar este proyecto.

A Rodrigo Velázquez-Durán por su apoyo durante los análisis biogeoquímicos y enzimáticos realizados a las muestras de la presente tesis. Al Laboratorio de Biogeoquímica de Suelos, IIES, UNAM por el apoyo brindado durante el experimento de incubación y los análisis biogeoquímicos y enzimáticos.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad de formarme académicamente y establecer bases para mi desarrollo profesional.

Al Dr. John Larsen, por sus enseñanzas dentro y fuera del aula, por compartirme su visión y ser mi guía durante todos estos años y, sobre todo, por la confianza depositada en mi y por motivarme siempre a mejorar. Gracias por la asesoría y amistad brindada.

Al Dr. Felipe García Oliva por la buena disposición, apoyo y enseñanzas que me brindó a lo largo de todo el desarrollo de este proyecto, el cual enriqueció mucho. Agradezco enormemente todo lo que aportó a este trabajo y a mi.

Al Dr. Alejandro Alarcón, por sus oportunas observaciones y contribuciones en el transcurso y conclusión de este proyecto.

Al comité sinodal, Dra. Marta Astier Calderón, Dr. Erick de la Barrera Montpellier, Dr. Roberto Lindig Cisneros y Dr. Bruno Chávez Vergara, por aceptar ser parte del jurado de examen y por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Agroecología, Dante, Rebe, Tsiri, Netza, Omar, Carlos, Pablo, Miguel, Marce, Fani, Rosa, Lucero, Ceci, Ricardo por su apoyo, amistad y ejemplo de compañerismo. Especialmente a Andrea Raya, por su apoyo y compañía en toda esta etapa.

A los miembros del Laboratorio de Biogeoquímica, Rodrigo, Alberto, Pamela, Yunúen, Cristina, que me apoyaron en diferentes momentos de este proceso.

A mis padres, por su cariño y apoyo incondicional. Porque me impulsan siempre y porque esto es posible gracias a ellos.

A mis hermanos, Netza, Brenda, Gandhi, Irma; a mis cuñados Mónica y Rafa. Por su cariño y sus consejos, por ser inspiración y ejemplo para mi, y por todos los buenos momentos juntos.

A Frida y Paula, por alegrarme el corazón.

A Andrés, por su cariño, apoyo incondicional, su actitud positiva y por creer en mi siempre. Gracias por estar a mi lado en todo momento.

A Andrea, Rebeca, Zareth, Nayelli, Mónica, Selma, Paulina, Karen, Dante, Eric, Ricardo por su amistad, por todos los buenos momentos, el apoyo y cariño.

A Leonarda Terán Cárdenas, Armando Rodríguez, Lilia Jiménez, Lilia Espinoza y Ma. Del Coro Arizmendi por todo el apoyo administrativo durante mi posgrado.



## **DEDICATORIA**

*A la vida, por poner tan maravillosas personas y experiencias en mi camino*

*A mi familia*

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS .....	IV
RESUMEN .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	2
2.1 Uso de plaguicidas .....	2
2.2 Impactos de los plaguicidas en el ambiente (suelo) .....	9
2.3 Suelo-Rizósfera .....	9
2.4 Microorganismos del suelo .....	11
2.5 Efectos de plaguicidas en los microorganismos del suelo .....	13
2.6 Influencia de factores ambientales sobre los efectos de plaguicidas .....	15
3. HIPÓTESIS .....	16
4. OBJETIVOS .....	16
5. METODOLOGÍA .....	17
5.1 Características y muestreo del suelo .....	17
5.2 Diseño experimental .....	17
5.3 Efecto de plaguicidas en los microorganismos del suelo -ensayo sin plantas .....	18
5.3.1 Experimento in vitro .....	18
5.3.2 Determinación de la respiración microbiana .....	19
5.3.3 pH y humedad .....	20
5.3.4 Análisis de nutrientes en el suelo .....	20
5.3.5 Concentraciones de C, N y P en el rastrojo de maíz .....	20
5.3.6 Nutrientes disponibles en el suelo .....	21

5.3.7	Nutrientes disueltos en el suelo .....	21
5.3.8	Actividad enzimática .....	21
5.3.9	Abundancia microbiana .....	22
5.4	Efecto de plaguicidas en los microorganismos del suelo -ensayo con plantas .....	23
5.4.1	Experimento en invernadero .....	23
5.4.2	Condiciones en el invernadero .....	24
5.4.3	Cosecha .....	24
5.4.4	Desempeño vegetal .....	24
5.4.5	Colonización micorrízica .....	24
5.4.6	C, N y P en el tejido vegetal .....	24
5.4.7	Abundancia microbiana .....	25
5.5	Análisis estadísticos .....	25
6.	RESULTADOS .....	26
6.1	Efecto de plaguicidas en los microorganismos del suelo -ensayo sin plantas .....	26
6.1.1	Nutrientes del rastrojo de maíz .....	26
6.1.2	Análisis pre-incubación (tiempo cero) .....	26
6.1.3	Análisis post-incubación .....	27
6.1.4	Abundancia microbiana .....	28
6.1.5	Respiración microbiana .....	29
6.1.6	Nutrientes disueltos en el suelo .....	30
6.1.7	Nutrientes disponibles en el suelo .....	31
6.1.8	Actividad enzimática .....	31
6.1.9	pH .....	34
6.2	Efecto de plaguicidas en los microorganismos del suelo -ensayo con plantas .....	34
6.2.1	Abundancia microbiana .....	36
6.2.2	Desempeño vegetal y clorofila .....	38

6.2.3	Nutrientes en raíces y parte aérea en maíz .....	39
7.	DISCUSIÓN .....	43
7.1	Efecto de plaguicidas en los microorganismos del suelo –ensayo sin plantas .....	43
7.1.1	Abundancia de los microorganismos del suelo .....	43
7.1.2	Actividad de los microorganismos del suelo .....	44
7.1.3	Nutrientes en el suelo (transformaciones del C, N y P) .....	45
7.2	Efecto de plaguicidas en los microorganismos del suelo –ensayo con plantas .....	46
8.	CONCLUSIONES .....	48
9.	PERSPECTIVAS .....	49
10.	LITERATURA CITADA .....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Fig. 1. Vía de degradación del Carbendazim (University of Minnesota. Biocatalysis/Biodegradation Database) .....	4
Fig. 2. Vía de degradación de Glifosato en el suelo. Giesy <i>et al.</i> , 2000 (adaptación de Franz <i>et al.</i> , 1997) .....	6
Fig. 3. Vía de degradación del Carbofurán. (a) Hidrólisis de los metabolitos por varios grupos de bacterias y (b) la degradación por hongos puede ocurrir a través de la hidroxilación y oxidación a 3-Ketocarbofuran (Ortíz-hernández <i>et al.</i> , 2013; University of Minnesota. Biocatalysis/Biodegradation Database) .....	7
Fig. 4. Método de incubación aeróbica del suelo .....	19
Fig. 5. Proceso para determinar la respiración de los microorganismos del suelo .....	20
Fig. 6. Etapas del método de extracción de ácidos grasos, tomado de Wang y Jiang, 2016 .....	22
Fig. 7. Abundancia microbiana en el suelo: a) Bacterias Gram-negativas; b) y c) Bacterias Gram-positivas; d) y e) Hongos Saprófitos; f) Actinomicetes. Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes .....	28
Fig. 8. CO <sub>2</sub> -C total emitido. Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con materia orgánica (+MO) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin materia orgánica (-MO) en cada gráfica. Barras con * significan que las medias entre tratamientos sin y con materia orgánica son significativamente diferentes. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes .....	29
Fig. 9. Nutrientes orgánicos disueltos: a) COD, b) NOD y c) POD. Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con materia orgánica (+MO) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin	

materia orgánica (-MO) en cada gráfica. Barras con \* significan que las medias entre tratamientos sin y con materia orgánica son significativamente diferentes. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes ..... 30

Fig. 10. Nutrientes disponibles: a), b) y c) PO<sub>4</sub>; d) y e) NH<sub>4</sub>; f) y g) NO<sub>3</sub>. Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con materia orgánica (+MO) o fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin materia orgánica (-MO) o fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con \* significan que las medias entre tratamientos sin y con materia orgánica son significativamente diferentes. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes ..... 32

Fig. 11. Actividad enzimática: a) y b) Glucosidasa; c), d) y e) Fosfomonoesterasa; f) β-N-acetylglucosaminidasa (NAG). Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con materia orgánica (+MO) o fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin materia orgánica (-MO) o fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con \* significan que las medias entre tratamientos sin y con materia orgánica son significativamente diferentes. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes ..... 33

Fig. 12. pH del suelo. Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con materia orgánica (+MO) o fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin materia orgánica (-MO) o fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con \* significan que las medias entre tratamientos sin y con materia orgánica son significativamente diferentes. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes..... 34

Fig. 13. Abundancia microbiana en el suelo: a) y b) Bacterias Gram-negativo; c) Hongos saprófitos. Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con materia orgánica (+MO) o fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin materia orgánica (-MO) o fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con \* significan que las medias entre tratamientos sin y con materia orgánica son significativamente diferentes. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes ..... 36

Fig. 14. Colonización de HMA (a) y abundancia de HMA extraradical (b). Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con materia orgánica (+MO) o fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin materia orgánica (-MO) o fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con \* significan que las medias entre tratamientos sin y con materia orgánica son significativamente diferentes. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes ..... 37

Fig. 15. Plantas de maíz después de 8 semanas de crecimiento bajo los diferentes tratamientos aplicados ..... 38

Fig. 16. Peso seco aéreo (a), radical (b) y Clorofila (c) de las plantas de maíz. Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes ..... 39

Fig. 17. Concentración de N en parte aérea (a), raíces (b) y N total en parte aérea (c) y raíces (d). Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes ..... 40

Fig. 18. Concentraciones de P en parte aérea (a), raíces (b) y P total en parte aérea (c) y raíces (d). Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes ..... 41

Fig. 19. Concentraciones de C total en parte aérea (a) y raíces (b). Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes ..... 42

Cuadro 1. Diseño experimental de las dos fases de evaluación .....	18
Cuadro 2. Macro y micro nutrientes utilizados en la fertilización .....	23
Cuadro 3. Resumen de los resultados biogeoquímicos de los análisis del suelo antes de la incubación (tiempo cero) .....	26
Cuadro 4. Valores de F y $p$ del análisis de varianza con plaguicidas (Plag), materia orgánica (MO) y Fósforo (P) como principales factores y su interacción sobre las variables examinadas. * indica diferencias significativas (* $p$ <0.05; ** $p$ <0.01;*** $p$ <0.001) que son interpretadas en los resultados .....	27
Cuadro 5. Valores de F y $p$ del análisis de varianza con plaguicidas (Plag), materia orgánica (MO) y Fósforo (P) como principales factores y su interacción sobre las variables examinadas. * indica diferencias significativas (* $p$ <0.05; ** $p$ <0.01;*** $p$ <0.001) que son interpretadas en los resultados .....	35



## RESUMEN

La aplicación de plaguicidas juega un papel importante en la productividad agrícola, sin embargo, puede alterar significativamente la dinámica de las poblaciones microbianas en el suelo y potencialmente el crecimiento de las plantas. En este trabajo, se determinó mediante un experimento in vitro el efecto de tres plaguicidas (Carbendazim, Glifosato y Carbofurán) sobre la abundancia microbiana, su actividad en términos de respiración y producción de exo-enzimas y la transformación de C, N y P, en condiciones de adición de materia orgánica y P mineral. Así mismo, se evaluó en invernadero el impacto de los plaguicidas sobre las micorrizas en maíz, la microbiota asociada y el desempeño vegetal, y la influencia de la materia orgánica y el P mineral. En ambos experimentos el diseño fue un factorial triple completo: 1) Plaguicida (sin aplicación, Carbendazim, Glifosato y Carbofurán), 2) Materia orgánica (0 y 0.5% de rastrojo de maíz) y 3) Fertilización mineral con fósforo (0 y 100 ppm  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), para un total de 16 tratamientos con 4 réplicas cada uno. La adición de los tres plaguicidas resultó en el incremento de la respiración de los microorganismos nativos del suelo, así como en la disminución de la abundancia microbiana. Todos los factores examinados afectaron la actividad enzimática y concentraciones de C, N y P en el suelo. Los tres plaguicidas inhibieron la nitrificación y la colonización en raíces y suelo de los hongos micorrízicos arbusculares. Se observó que al combinar Carbendazim y P se promovió el crecimiento vegetal, lo cual coincidió con la completa eliminación de la asociación micorrízica. Esto sugiere que el fungicida alivió una posible depresión del crecimiento causado por la micorriza cuando el P se encontraba disponible. El Carbofurán inhibió el crecimiento vegetal, lo que sugiere posibles efectos fitotóxicos del insecticida. En conclusión, los plaguicidas utilizados afectaron diferencialmente a la comunidad microbiana y sus actividades, así como al desempeño vegetal, pero su impacto parece depender de la presencia de materia orgánica y P mineral en el suelo.

## ABSTRACT

Pesticide application plays an important role in agricultural productivity; however, it can disrupt significantly the dynamics of microbial populations in soil and potentially impair plant growth. In this study the effect of different pesticides (Carbendazim, Glyphosate and Carbofuran) on the microbial community structure, microbial activity in terms of respiration and exo-enzyme production and the transformation of carbon, nitrogen and phosphorus, as affected by organic matter amendment and mineral phosphorus fertilization, was examined by an *in vitro* experiment. Moreover, the impact of pesticides and the influence of organic matter and mineral P on maize mycorrhiza and associated microbiota and plant growth performance, was examined in a greenhouse pot experiment. In both experiments the design was a complete triple factorial: 1) Pesticides [without application, Carbendazim, Glyphosate and Carbofuran, 2) Organic matter (0 and 0.5% maize stover) and 3) Phosphorus mineral fertilization (0 and 100 ppm  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), for a total of 16 treatments with four replicates were used. The addition of the three pesticides resulted in increased respiration of native soil microorganisms and in reducing microbial biomass. All factors examined also affected soil enzyme activities and C, N and P concentrations in soil. The three pesticides inhibited nitrification and root and soil colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. Plant growth promotion was observed by combining Carbendazim and P, which coincided with the complete elimination of the mycorrhiza association suggesting that carbendazim was alleviating a possible plant growth depression caused by the mycorrhizal association when P was not limited. Carbofuran resulted in impaired plant growth independent of organic matter and P application, suggesting possible phytotoxic effects of this insecticide. In conclusion, the pesticides examined differentially affected the microbial community, microbial activity, and growth of maize plants, but their impact seems to depend on the presence of both organic matter and mineral P in the soil.

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso de plaguicidas (incluyendo fungicidas, herbicidas, insecticidas y otros) juega un papel importante en las prácticas agrícolas actuales como el principal método utilizado para el manejo de organismos plagas y, en general, el uso de estos plaguicidas ha permitido un incremento en el rendimiento y calidad de los cultivos agrícolas (Alatorre *et al.*, 2000; Aktar *et al.*, 2009).

Sin embargo, se sabe que el uso extensivo de plaguicidas ha dado lugar a efectos negativos en el ambiente. Dado que incluso si la aplicación es aérea, posterior a su aplicación éstos comúnmente llegan al suelo en el cual se pueden acumular, contaminar el suelo, inducir la resistencia de los patógenos a los plaguicidas e impactar en otros organismos no objetivo que habitan en el suelo (Topp *et al.*, 1997; Arias-Estévez *et al.*, 2008; Aktar *et al.*, 2009).

Muchos plaguicidas afectan adversamente a la actividad de los microorganismos del suelo, lo cual cobra una gran importancia debido a que éstos están involucrados en funciones vitales de las dinámicas del suelo, lo cual afecta su fertilidad y como consecuencia el desempeño vegetal, impactando de esta manera, la sostenibilidad en la agricultura (Moorman, 1989; Alatorre *et al.*, 2000; Aktar *et al.*, 2009; Gill y Garg, 2014). Sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de plaguicidas aplicados en el suelo y la importancia de esta práctica en la agricultura actual, el conocimiento sobre los efectos colaterales de estos químicos en los organismos del suelo es limitado.

La mayoría de las investigaciones enfocadas en evaluar los efectos de plaguicidas sobre los microorganismos del suelo se ha llevado a cabo sin considerar otros factores ambientales (Moorman, 1989; Johnsen *et al.*, 2001; Bünemann *et al.*, 2006; Lo, 2010). Dado que el suelo es uno de los componentes más importantes de los ecosistemas donde se dan interacciones biológicas (Gerrard, 2000; Sarnaik *et al.*, 2006), es necesario que se realicen estudios que analicen cómo los plaguicidas y su interacción con otros factores en el suelo como la disponibilidad de nutrientes y el tipo y cantidad de materia orgánica afectan a los microorganismos del suelo y sus actividades.

Por lo anterior, en el presente proyecto de investigación se evaluaron los efectos de plaguicidas en la actividad y composición de la comunidad de los microorganismos del suelo, así como sobre la dinámica de nutrientes en el suelo y sobre el desempeño vegetal, y cómo dichos efectos son influenciados por la adición de materia orgánica y la disponibilidad de P en el suelo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Uso de plaguicidas

El constante crecimiento de la población mundial y por consecuencia la demanda de alimentos ha llevado a que el aumento en la producción agrícola sea un tema prioritario. En este intento, una de las principales problemáticas que enfrenta la agricultura actual es la presencia de diferentes plagas, que afectan desde la producción de los cultivos hasta el almacenamiento de granos y semillas (Alatorre *et al.*, 2000; Brechelt, 2004). La FAO (2012) ha estimado que cerca del 20 al 40% de la producción agrícola mundial se ha reducido debido a plagas y enfermedades. Para poder contrarrestar este problema, la aplicación de plaguicidas se ha convertido en una práctica agrícola de gran importancia.

Se entiende por plaguicida para uso agrícola a cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se usan de manera intensiva para controlar la proliferación de plagas de los cultivos para evitar las pérdidas en la producción de alimentos. Entendiéndose por plaga cualquier especie, raza o biotipo vegetal, animal, microorganismo o agente patógeno dañino que, por su nivel de ocurrencia y dispersión, constituya un grave riesgo para el estado fitosanitario de las plantas o productos vegetales (FAO, 2006; COFEPRIS, 2015).

El uso de plaguicidas es una práctica agrícola que ha sido comúnmente utilizada como uno de los métodos principales de control de organismos plagas dentro de sistemas agrícolas, con el fin de mejorar el rendimiento de los cultivos y la calidad de los productos cosechados (Aktar *et al.*, 2009).

Así, el incremento significativo a nivel mundial de la productividad de los cultivos en los últimos años es en parte el resultado de una mayor aplicación de fertilizantes y plaguicidas. Este fenómeno cobra vital importancia en la agricultura convencional la cual alimenta a una población en constante crecimiento y cuyo principal reto es mantener la producción a ese nivel y reducir la escasez de alimentos (World Health Organization, 1990; Tilman *et al.*, 2001).

Los plaguicidas son uno de los productos químicos más utilizados en la actualidad; aproximadamente mil sustancias químicas en más de cincuenta mil formulaciones o nombres comerciales son ampliamente usadas en todo el mundo como insecticidas, fungicidas, herbicidas

rodenticidas y antimicrobianos (Karam *et al.*, 2004). De acuerdo con la FAO (2012), las ventas mundiales de plaguicidas ascienden a los 45 mil millones de dólares al año.

En México, la aplicación de plaguicidas es una práctica frecuente. La aplicación intensiva de plaguicidas sintéticos se inició hacia 1948 en el país con la introducción del DDT (diclorodifeniltricloroetano) y posteriormente, de otros plaguicidas organoclorados. Después se agregaron diversos organofosforados, carbamatos y una gran variedad de herbicidas y fungicidas, todo lo cual estuvo relacionado con la llegada de la Revolución Verde (Albert, 2005).

A pesar de la aplicación intensiva, no se cuentan con datos actuales ni se conoce con certeza la cantidad de plaguicidas que se aplican a los cultivos cada año. A principios del año 2000, los registros oficiales de consumo reportaban alrededor de cincuenta mil toneladas anuales de ingrediente activo, con un valor del mercado calculado entre cuatrocientos y seiscientos millones de dólares (Albert, 2005). Más recientemente, se ha calculado que el promedio anual de consumo aparente de plaguicidas en México se encuentra en poco más de 35 mil toneladas (Ortíz, *et al.*, 2013). Sin embargo, es posible que dichos datos sobre la cantidad de plaguicidas que se usa actualmente en el país subestimen los valores reales.

Los plaguicidas se pueden agrupar de acuerdo a los organismos que controlan: insecticidas, fungicidas, herbicidas, nematocidas, acaricidas, rodenticidas, bactericidas y molusquicidas. Aunque esto varía según el cultivo, en términos generales los plaguicidas de mayor uso son los herbicidas, seguidos de insecticidas y fungicidas (Albert, 2005; Martínez y Gómez, 2007). A continuación se enlistan tres plaguicidas de uso común y sobre los cuales se enfocó el presente trabajo:

### ***Carbendazim***

Carbendazim (Metilbenzimidazol-2-il carbamato) es un fungicida (de benzimidazol) sistémico usado comúnmente en el mundo, el cual se utiliza para controlar un amplio rango de enfermedades causadas por hongos en cultivos herbáceos, frutales, vegetales, ornamentales y hierbas medicinales (Fang *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011). Es además producto primario de degradación por hidrólisis de otros dos fungicidas sistémicos, benomil y tiofanato de metilo (Fleeker y Lacy, 1997; Mazellier *et al.*, 2002).

El Carbendazim es un compuesto estable con una vida media larga, muy persistente en agua, suelos, cultivos y comida, descomponiéndose en el ambiente con vida media de 3-12 meses en el suelo. Por lo tanto, éste puede persistir en los sitios de aplicación por un largo período de tiempo y fácilmente

inducir efectos acumulativos (Lin *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). El metabolismo microbiano se sugiere como la principal vía de degradación (Yarden *et al.*, 1990; Kiss y Virag, 2009; Zhang *et al.*, 2013), pudiendo ser utilizado como fuente de carbono y nitrógeno (Pandey *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). La vía de degradación del Carbendazim se presenta en la figura 1.

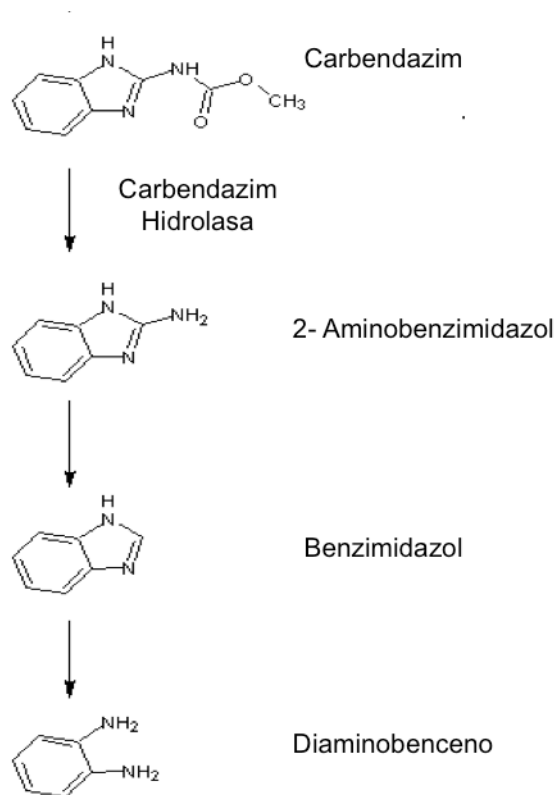


Figura 1. Vía de degradación del Carbendazim (University of Minnesota. Biocatalysis/Biodegradation Database).

Los residuos de carbendazim en frutos, plantas y suelos pueden ser perjudiciales para la salud humana, animales y plantas y se puede transferir a través de las cadenas tróficas (Fernandez *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2011). De acuerdo a diferentes estudios, esta sustancia fue detectada en frutos y hojas de plantas incluso después de ser cosechadas (Chiba y Veres, 1980; Kiiigemagi *et al.*, 1991).

El compuesto es absorbido a través de las raíces y los tejidos verdes. La parte absorbida por las raíces es translocada acropetalamente por el xilema hacia las hojas, donde se puede observar un movimiento translaminar dentro de la hoja. El Carbendazim actúa mediante la inhibición del desarrollo de los tubos germinativos de los hongos, la formación de apresorios y el crecimiento del micelio. Esta sustancia ejerce su actividad fungicida al unirse a la proteína tubulina, interrumpiendo

el ensamblaje de los microtúbulos, con lo cual se impide la formación del huso acromático, y por lo tanto resulta en la mala segregación de los cromosomas durante la división celular, dando lugar a células anormales que provocan la muerte del hongo. De esta manera, el Carbendazim inhibe la mitosis (hoja informativa Carbendazim; Pfeil y Dellarco, 2005; Salunkhe *et al.*, 2014).

### ***Glifosato***

Glifosato (N-fosfonometilglicina) es un herbicida post-emergente de amplio espectro, no selectivo, utilizado para eliminar malezas indeseables principalmente en zonas agrícolas y forestales, solamente las variedades vegetales genéticamente modificadas son resistentes a este compuesto. Glifosato es uno de los plaguicidas utilizados con mayor frecuencia en la agricultura, especialmente en cultivos de maíz, soya y arroz (Smith y Oehme, 1992; De Jonge *et al.*, 2001; Monroy *et al.*, 2005).

El efecto herbicida ocurre primariamente a través de las hojas, traslocándose a toda la planta utilizando la vía de la fotosíntesis, produciendo la inactivación de la enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintetasa. Con lo anterior se inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), a través de la vía del ácido shikímico, los cuales son esenciales para la síntesis de proteínas y en el metabolismo secundario de las plantas. Cuando se aplica directamente al suelo, el Glifosato muestra poca actividad herbicida debido a la inactivación en el suelo como resultado de la adsorción (Sprankle *et al.*, 1975 a y b; Amrhein *et al.*, 1980; Glass, 1987; Monroy *et al.*, 2005). Se sugiere que el glifosato se une al suelo a través de la fracción de ácido fosfónico, y por lo tanto, compete con el fosfato inorgánico por los sitios de sorción (Sprankle *et al.*, 1975b; De Jonge *et al.*, 2001).

Además, el producto comercial contiene agentes surfactantes que le permite al Glifosato penetrar a través de las cutículas foliares y las membranas celulares hidrofóbicas de las malezas. Algunos efectos tóxicos pueden provenir también de estos surfactantes (Martino, 1995; Franz *et al.*, 1997; Burger *et al.*, 2004).

La microbiota es considerada la vía principal para la degradación de este herbicida, lo cual determina su persistencia en el suelo (Souza *et al.*, 1999). La degradación del glifosato por parte de los microorganismos produce el metabolito ácido amino metil fosfónico (AMPA), dando paso a la producción de agua, dióxido de carbono, amonio y fosfato (Rueppel *et al.*, 1977; Forlani *et al.*, 1999). La vía de degradación del Glifosato se muestra en la figura 2.

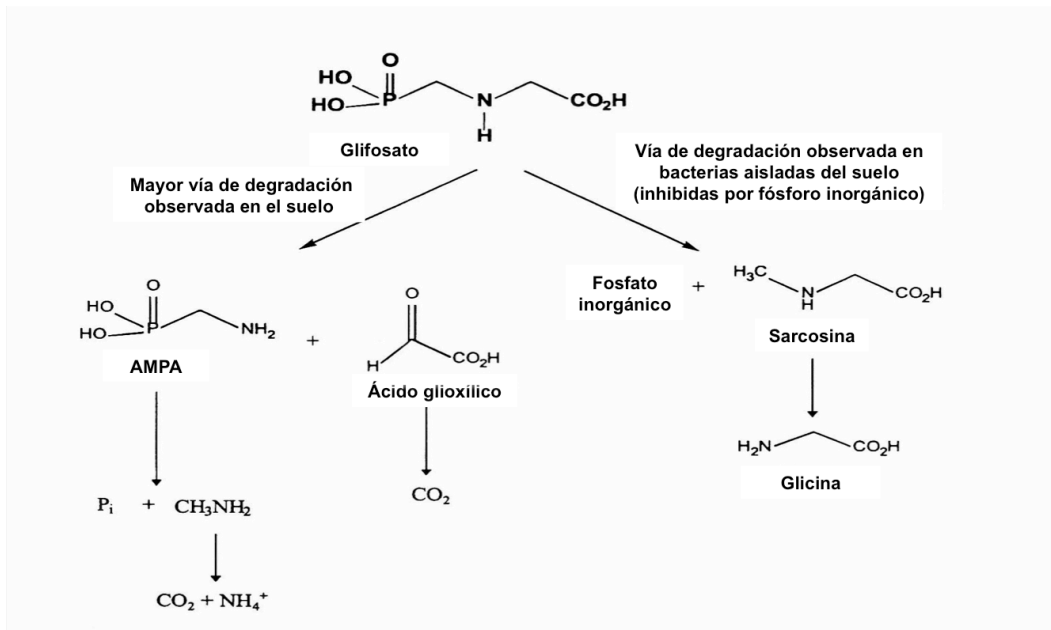


Figura 2. Vía de degradación de Glifosato en el suelo. Giesy *et al.*, 2000 (adaptación de Franz *et al.*, 1997).

Al no ser compartida la enzima que inactiva el Glifosato con animales, la citotoxicidad del glifosato es considerada relativamente baja o inexistente por lo que es catalogado como de bajo riesgo (Bentley, 1990; Monroy *et al.*, 2005). Se considera además que este herbicida tiene otras cualidades deseables, ya que no hay ninguna actividad residual en el suelo, no se filtra hacia áreas no objetivo, y no es volátil. También se considera que es prácticamente no tóxico para los mamíferos, aves y peces, debido a que no muestra bioacumulación en la cadena. Por lo tanto, cuando se utiliza correctamente, el glifosato es reportado como seguro para el ambiente y sus habitantes (Smith y Oehme, 1992; Franz *et al.*, 1997; Duke and Powles, 2008).

Sin embargo, investigaciones realizadas indican que puede alterar otros procesos celulares en animales lo que puede presentar un factor de riesgo a nivel ambiental y de salud en las zonas donde se emplea este herbicida (Smith y Oehme, 1992; Monroy *et al.*, 2005). Además, la vía del ácido shikímico está presente en los microorganismos y uno de los surfactantes comúnmente incluidos en el producto de Glifosato, polioxietileno amina, es potencialmente tóxico para los microorganismos, por lo que la alteración potencial de las comunidades microbianas del suelo y sus procesos ha despertado interés (Carlisle y Trevors, 1988; Bentley, 1990; Tsui y Chu, 2003).



## Carbofurán

El Carbofurán (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metilcarbamato) es un plaguicida sistémico de amplio espectro comúnmente utilizado como insecticida, acaricida y nematocida en una gran variedad de cultivos, especialmente maíz, trigo, arroz, soya, papas, frutas y hortalizas, entre muchos otros, que pertenece al grupo químico de los carbamatos (N-methyl). Conjuntamente con los insecticidas organofosforados, los compuestos piretroides y otros carbamatos, el carbofurano integra un grupo sustituto de insecticidas persistentes como el DDT, clordano y heptacloro (Mahalakshmi *et al.*, 2007; RAP-AL, 2008; Hernández-Shek *et al.*, 2012).

En el suelo el Carbofurán es moderadamente persistente, con una vida media de 30 a 120 días y tiene una movilidad variable dependiendo de la textura del suelo. Por lo anterior, se considera un peligro significativo de contaminación para las aguas subterráneas. Se degrada principalmente por acción microbiológica, generando dióxido de carbono (RAP-AL, 2008; INECC, 2015). La vía de degradación del Carbofurán es presentada en la figura 3.

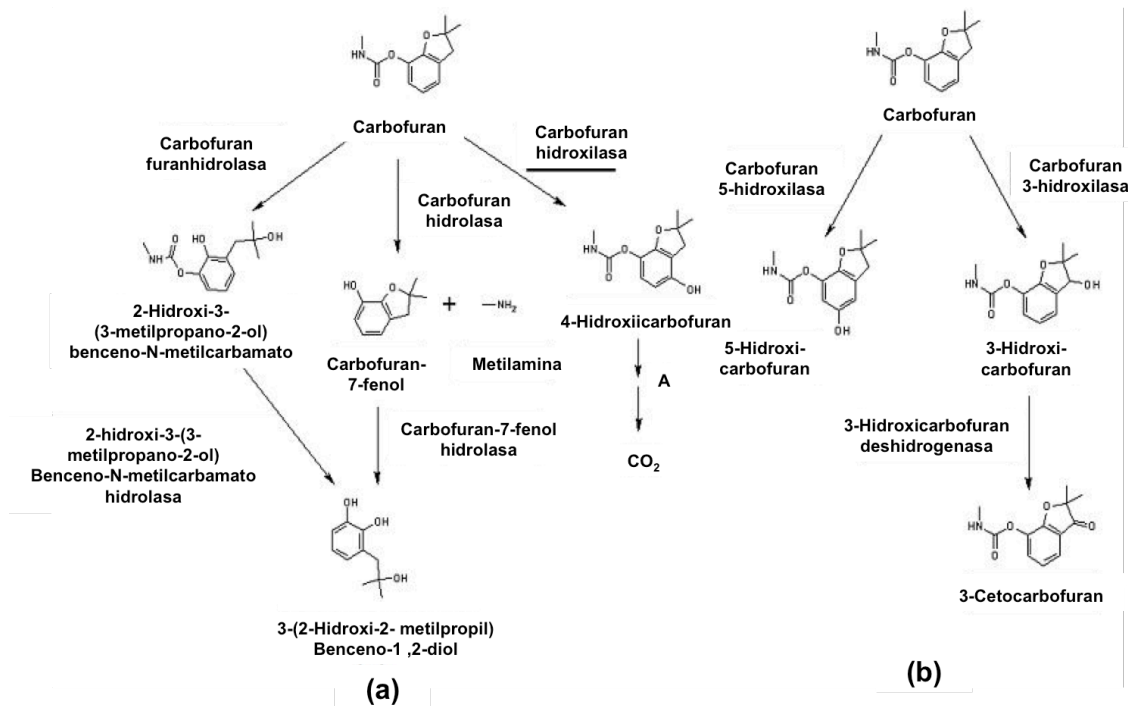


Figura 3. Vía de degradación del Carbofurán. (a) Hidrólisis de los metabolitos por varios grupos de bacterias y (b) la degradación por hongos puede ocurrir a través de la hidroxilación y oxidación a 3-Ketocarbofurán. (Ortíz-hernández *et al.*, 2013; University of Minnesota. Biocatalysis/Biodegradation Database).

Este agroquímico actúa mediante la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), que es responsable de la degradación hidrolítica de la acetilcolina (ACh), un importante neurotransmisor. La inhibición de la AChE en consecuencia, conduce a la acumulación excesiva de acetilcolina en las sinapsis y las uniones neuromusculares, lo que resulta en una sobreestimulación de los receptores de ACh, que en última instancia podrían terminar en la muerte por insuficiencia respiratoria (Fukuto, 1990; Gupta, 1994). AChE está presente en un amplio rango de animales, incluyendo mamíferos, aves, peces, reptiles e insectos (Karczmar *et al.*, 1970; de la Torre, *et al.*, 2002)

El compuesto ingresa en los organismos principalmente por contacto e ingestión, y en menor medida por inhalación. Su efecto sistémico, al ser absorbido por las raíces de las plántulas, le confiere acción de ingestión sobre pulgones e insectos de las partes aéreas (RAP-AL, 2008).

Como resultado de su uso extendido, Carbofurán ha sido detectado en suelo, aguas subterráneas, superficiales y el agua de lluvia (Richards *et al.*, 1987; Waite *et al.*, 1992; Mahttiessen *et al.*, 1995; Otieno *et al.*, 2010). Se reconoce también que el Carbofurán es extremadamente tóxico para abejas, zooplancton, crustáceos, peces y aves (INECC, 2015), los cuales son clave en la salud de diversos ecosistemas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica al Carbofurán en el grupo identificado como 1b, lo que significa “altamente peligroso”. Sin embargo, en el caso de ingestión en forma directa o de residuos existentes en alimentos, es “extremadamente tóxico”. Este insecticida se encuentra además en la Lista Consolidada de Productos Prohibidos o Restringidos por Naciones Unidas y en la lista de plaguicidas y productos químicos peligrosos objeto de comercio internacional para la aplicación del Procedimiento de Consentimiento Fundamentado Previo (PIC) del Convenio de Rotterdam, por lo que la importación del producto se encuentra sujeta a las leyes o normas de cada país debido a su condición de sustancia peligrosa (RAP-AL, 2008). En México se encuentra en el registro de plaguicidas autorizados (COFEPRIS 2012).

Los beneficios de los plaguicidas en el control de plagas y vectores de enfermedades han derivado en un indudable incremento en la productividad agrícola contribuyendo a la seguridad alimentaria. Sin embargo, por su toxicidad intrínseca y su forma de uso, esta actividad tiene un impacto y un costo ambiental importante.

## **2.2 Impactos de los plaguicidas en el ambiente (suelo)**

Un plaguicida con características ideales debería resultar muy tóxico para los organismos objetivos, actuar rápidamente sobre ellos, que sus residuos permanezcan por cortos períodos de tiempo y que resulte completamente inocuo para el resto de los organismos (Anderson, 1989; Johnsen, *et al.*, 2001; Aktar *et al.*, 2009). Sin embargo, menos del 0.1% de los plaguicidas que se aplican llegan al organismo objetivo, por lo que el 99.9% de los plaguicidas se mueve en el entorno en el cual se da la contaminación inmediata del ambiente: el suelo, aguas superficiales y subterráneas y la atmósfera. Además, afectan negativamente a la salud pública y la biota benéfica, al afectar el equilibrio fisiológico de todos los organismos expuestos (Pimentel y Levitan, 1986; Pimentel *et al.*, 1992; Albert y Benítez, 2005).

La mayoría de los plaguicidas presentan toxicidad para otros seres vivos debido a que éstos actúan inhibiendo o modificando funciones vitales para la plaga a controlar, y en muchos casos estas funciones se encuentran en otros organismos, y así afecta directa o indirectamente a otros organismos y procesos. Debido a esta característica de toxicidad inherente, los organismos son más propensos a ser afectados por éstos que por otros agroquímicos (World Health Organization, 1990; Igbedioh, 1991; Aktar *et al.*, 2009).

Por tanto, y a pesar de que el uso de plaguicidas ha permitido incrementar la producción agrícola, el uso y acumulación en los suelos de éstos posee diversos riesgos de salud humana e impactos ambientales adversos. Una de las principales preocupaciones medioambientales relacionadas con plaguicidas es su potencial para afectar el suelo, que es controlado primariamente por su persistencia y movilidad en el suelo, lo cual incluye el efecto que pueden tener sobre los grupos no objetivo que ahí habitan (Walker, 2003).

## **2.3 Suelo- Rizosfera**

El suelo constituye un recurso natural de gran importancia ya que desempeña funciones indispensables para el sustento de la vida en este planeta, es donde se llevan a cabo la mayoría de las actividades humanas, es fuente de alimentos para la biota del suelo y producción primaria, es hábitat de miles de organismos y regula los ciclos del agua y los biogeoquímicos (Volke *et al.*, 2005; Contreras, 2005). Además, las partículas minerales y la materia orgánica del suelo pueden retener sustancias mecánicamente o fijarlas por adsorción, mientras que los microorganismos de los suelos

pueden metabolizar sustancias exógenas lo cual contribuye a la protección de aguas subterráneas y superficiales contra la penetración de agentes nocivos (Volke *et al.*, 2005; Contreras, 2005).

Además, el suelo provee un medio en el cual vive una asombrosa variedad de organismos. Estos organismos no solamente usan el suelo como hábitat y fuente de energía, también contribuyen a su formación, e influyen fuertemente las propiedades físicas y químicas y la naturaleza de la vegetación que crece en él (Bardgett, 2005; Sposito, 2008). Tan solo un kilogramo de suelo no contaminado sirve como hábitat para hasta 10 trillones de bacterias, 10 billones de actinomicetos y 1 billón de hongos. Incluso la población de microfauna (por ejemplo, protozoos) puede acercarse a 1 billón en un kilogramo de suelo (Sposito, 2008).

El crecimiento microbiano más importante, sin embargo, tiene lugar en la superficie de las partículas del suelo, normalmente en la zona conocida como rizosfera (Contreras, 2005). Esto debido a que es una región altamente favorable para la proliferación y actividad metabólica de numerosos microorganismos (Nannipieri *et al.*, 2003).

La rizosfera comprende la región del suelo ocupada por las raíces de las plantas y que es afectada por la actividad de las mismas. Esta región es apropiada para la proliferación de una comunidad microbiológica altamente diversa y dinámica, cuya actividad se vincula con distintos procesos relacionados con el agua, nutrición mineral, intercambio de cationes y producción de exudados, entre muchos otros, que la hacen diferente del suelo en sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Jaramillo, 2011).

Un ejemplo de ello es el pH o potencial de iones hidrógeno, que en la rizosfera es más ácido por el intercambio catiónico y por la producción de ácidos orgánicos; el potencial de agua también disminuye, así como la presión parcial de oxígeno. La existencia de exudados mucilaginosos influye en la agregación de las partículas del suelo interviniendo en el mantenimiento de la estabilidad del suelo frente a la erosión y la acción del agua; se segregan compuestos fenólicos y hormonas vegetales que atraen y favorecen el establecimiento de colonias de bacterias y hongos; hay mayor acumulación de dióxido de carbono, debido a la actividad respiratoria, y de carbohidratos solubles procedentes exudados de las raíces (Suresh y Bagyaraj, 2002; Martín *et al.*, 2011).

Dichos carbohidratos, producto de la fotosíntesis, son utilizados por los microorganismos como fuente de energía. De tal manera que esta zona de interacción entre raíces de plantas y microorganismos del suelo constituye un nicho rico en nutrientes, como resultado de tales

secreciones orgánicas constituidas por monómeros como glucosa y aminoácidos, polímeros como polisacáridos y proteínas, y restos de raíces (Hawes *et al.* 2003) y otras excreciones (Uren, 2007).

Se ha observado además, en estos exudados rizosféricos la existencia de multitud de proteínas con actividades enzimáticas diversas, fosfatasas, proteasas, ureasas, glutaminasas, deshidrogenasas y de diversidad de agentes quelantes o disolventes de elementos minerales que favorecen tanto el aprovechamiento de moléculas orgánicas, como de minerales por parte de la planta y de los microorganismos circundantes (Martín *et al.*, 2011). Así, el número de bacterias que hay en la rizosfera es de entre 10 y 1000 veces superior al de las bacterias que se encuentran en el suelo no rizosférico (Martín *et al.*, 2011).

La influencia de las raíces sobre la disponibilidad de nutrientes se ve reflejada en consecuencia en la dinámica de la microbiota compuesta principalmente por bacterias, actinomicetos, hongos y algas, la cual puede variar cualitativa y cuantitativamente, según las características del suelo, el tipo de fertilización, la especie vegetal y el área de la raíz considerada, y repercute de forma diferente en el crecimiento de las plantas y de otros microorganismos del suelo (Marschner *et al.*, 2004; Berg *et al.* 2005; Jaramillo, 2011).

La rizosfera es, por tanto, un microambiente único donde los microorganismos se encuentran en asociación con las raíces de las plantas, formando comunidades complejas y dinámicas. Estas comunidades cumplen diversas funciones en los procesos del suelo, presentando un potencial considerable tanto en fitoestimulación, como en biocontrol de patógenos de plantas y la degradación de compuestos contaminantes del suelo (Fitz y Wenzel, 2002; Martín *et al.*, 2011).

## **2.4 Microorganismos del suelo**

Los microorganismos del suelo son una comunidad ampliamente diversa e importante que catalizan una gran cantidad de procesos vitales en el suelo y pueden categorizarse en bacterias, actinomicetos, hongos, algas, nematodos y protozoarios (Gerrard, 2000).

Estos organismos airean el suelo, incrementan la porosidad y agregan ácidos orgánicos y dióxido de carbono al suelo. Dentro de las funciones que cumplen se encuentran también la descomposición de residuos orgánicos, con lo cual se extrae la materia y energía contenida en las moléculas de los

tejidos vegetales y es transferida a los microorganismos a partir de su descomposición. Como consecuencia de la descomposición completa de los residuos vegetales, ocurre una conversión de formas orgánicas a inorgánicas, este proceso es conocido como mineralización (Moorman, 1989; van der Heijden *et al.*, 2008).

Los microorganismos del suelo participan en la transformación biogeoquímica de elementos como el carbono, nitrógeno y fósforo en el suelo, con lo cual se incrementan la disponibilidad de nutrientes, y contribuye de esta forma a la fertilidad del suelo, al crecimiento de las plantas al liberar elementos esenciales para la nutrición vegetal y al mantenimiento de los ciclos de nutrientes (Moorman, 1989; van der Heijden *et al.*, 2008; Gerrard, 2000, Hayat *et al.*, 2010). Además ciertos grupos de microorganismos tienen también la capacidad de degradar contaminantes, como los plaguicidas en el suelo (Bending *et al.*, 2006; Zhao, 2009).

En la zona rizosférica, se presentan un amplio rango de interacciones entre microorganismos y las plantas que van desde simbióticas hasta patogénicas. En la biota benéfica se encuentran microorganismos solubilizadores y fijadores de nutrientes, promotores del crecimiento vegetal, inductores de resistencia vegetal a enfermedades y agentes de control biológico (Schippers *et al.*, 1987; Cano, 2011).

Ejemplos de estos microorganismos benéficos de la rizosfera incluyen simbioses como los hongos micorrízicos arbusculares. Las micorrizas arbusculares son asociaciones simbióticas mutualistas entre un grupo de hongos (Glomeromycota) y raíces de plantas superiores donde se encuentra la mayoría de las plantas de interés agrícola. Entre sus efectos benéficos para las plantas se encuentran la mayor absorción de elementos poco móviles en el suelo como el P, Cu y Zn, protección contra patógenos, mayor resistencia a la sequía, mejoramiento en la agregación del suelo, incremento de resistencia a plagas y la estimulación de sustancias reguladoras del crecimiento (Bethlenfalvay y Linderman, 1992; Smith y Read, 1997; Blacol y Salas, 1997).

Estas interacciones con potencial efecto benéfico son determinantes en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Cano, 2011). Todas estas funciones son de gran importancia, sin embargo, los microorganismos y por tanto sus servicios ecosistémicos, pueden verse afectados por diversos factores externos de uso antropogénico como el uso de plaguicidas.

## 2.5 Efectos de plaguicidas en los microorganismos del suelo

Los plaguicidas aplicados al suelo durante la plantación deben persistir durante el desarrollo de las raíces de las plantas. Por lo tanto, una porción del pesticida probablemente interactúa con los organismos en el suelo y la rizosfera (Wootton *et al.*, 1993).

Numerosos estudios han reportado los efectos de plaguicidas sobre los organismos no objetivo que se encuentran en el suelo (Johnsen *et al.*, 2001; Frampton *et al.*, 2006; Lo, 2010). Dentro de esto, mucho trabajo se ha dirigido a investigar las interacciones entre plaguicidas y los microorganismos nativos del suelo, debido al importante papel que juegan en la dinámica de los suelos, como ya ha sido mencionado. Los microorganismos pueden verse adversamente afectados debido a alteraciones en la estructura de la comunidad y sus funciones (Bünemann *et al.*, 2006), y por ende las actividades benéficas que realizan y que se encuentran directamente relacionadas con la fertilidad del suelo y consecuentemente con el desempeño de los cultivos, impactando de esta manera la sustentabilidad de la agricultura.

Los plaguicidas pueden alterar directa o indirectamente la estructura de las comunidades de microorganismos y sus actividades. Algunos plaguicidas pueden no tener efectos sobre los microorganismos, otros estimular o tener efectos depresivos sobre el crecimiento. En ese sentido, algunos grupos pueden ser suprimidos y proliferar otros que no se ven afectados por la toxicidad y que son capaces de degradarlos y usarlos como fuente de energía (Johnsen *et al.*, 2001; Girvan *et al.*, 2004). Por lo tanto, los estudios de los impactos de las aplicaciones de plaguicidas sobre las propiedades del suelo, las comunidades de microorganismos y sus actividades, cobran una gran importancia. Existen reportes variados e incluso contradictorios acerca de los efectos de plaguicidas sobre la microbiota del suelo, éstos dependen del tipo de plaguicida, dosis aplicadas y las condiciones del ambiente en general.

Se considera que los herbicidas generalmente no tienen efectos adversos sobre los microorganismos del suelo ya que son aplicados sobre las plantas (Johnsen *et al.*, 2001; Bünemann *et al.*, 2006). Los efectos observados del herbicida Glifosato sobre la composición de la comunidad microbiana han sido variados. Por ejemplo, algunos grupos de microorganismos del suelo como bacterias y hongos se han incrementado tras la adición del herbicida, probablemente asociado con la capacidad de éstos para metabolizarlo y aprovecharlo como fuente de energía y nutrientes (Lancaster *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2003; Ratcliff *et al.*, 2006). Así mismo, ha estimulado la actividad de enzimas como la ureasa (Sannino y Gianfreda, 2001). Ratcliff *et al.* (2006) observaron además cambios en la composición de la comunidad de una dominancia de hongos a una proporción igual de bacterias y hongos.

Por el contrario, el Glifosato ha provocado reducciones en grupos de microorganismos en el suelo (Busse *et al.*, 2001; Zobiole *et al.*, 2011; Araújo *et al.*, 2003). Las funciones microbianas pueden ser alteradas de la misma manera, por ejemplo, Sannino y Gianfreda (2001) observaron que Glifosato reduce la actividad de la fosfatasa, y Bennicelli *et al.* (2009) reportaron el mismo patrón para la deshidrogenasa. El crecimiento, desarrollo de la nodulación y la fijación de N por bacterias fijadoras también pueden ser inhibidos (Martensson, 1992; Santos y Flores, 1995) y la descomposición de materia orgánica ralentizada (Fletcher y Freedman, 1986; House *et al.*, 1987). El impacto negativo del Glifosato sobre los microorganismos de la rizosfera se puede reflejar en el crecimiento vegetal, como en el caso de la reducción de la biomasa aérea y de las raíces de las plantas, aunada a un decremento de los microorganismos del suelo, obtenida por Zobiole *et al.* (2011).

Los microorganismos del suelo expresan diferentes respuestas a los insecticidas. Como ejemplo se ha reportado en varias ocasiones un efecto estimulador del insecticida Carbofurán sobre la microbiota del suelo, incluyendo grupos funcionales como bacterias fijadoras de N, e incrementa la mineralización de C, N y P, indicando la derivación de energía de los productos degradados del insecticida (Dordevic *et al.*, 1998; Das and Mukherjee, 1998; Das y Mukherjee, 2000; Ahmed y Ahmad, 2006). Por el contrario, Carbofurán ha inhibido diferentes grupos de microorganismos (Wootton *et al.*, 1993; Dordevic *et al.*, 1998; Das *et al.*, 2003). Se ha observado además que este plaguicida causa un decremento significativo en el desarrollo de los hongos micorrízicos arbusculares, los cuales son importantes en la nutrición de sus plantas hospederas (Backman y Clark, 1977; Sreenivasa y Baguaraj, 1989; Veeraswamy *et al.*, 1993; Venkateswarlu *et al.*, 1994). Sin embargo, también se ha observado que con dosis menores se favoreció el desarrollo de estos hongos (Sreenivasa y Baguaraj, 1989; Venkateswarlu *et al.*, 1994).

Por otra parte, los fungicidas generalmente tienen mayor impacto sobre los microorganismos del suelo que los herbicidas e insecticidas (Bünemann *et al.*, 2006). Aplicaciones de Carbendazim han resultado en la reducción de la diversidad microbiana del suelo y cambios en la estructura de la comunidad (Yu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009a; Yan *et al.*, 2011). Así mismo se han reportado disminuciones en la actividad de las enzimas deshidrogenasa y en las concentraciones de nitrato (Burrows y Edwards, 2004), e incrementos en la concentración de amonio (Burrows y Edwards, 2004) y en la ureasa en el suelo (Yan *et al.*, 2011). Además, es bien reconocido el efecto negativo del Carbendazim sobre la colonización y desarrollo de los hongos micorrízicos arbusculares y, por tanto, sus actividades funcionales como la toma y transporte de P (Sreenivasa y Baguaraj, 1989; Larsen *et al.*, 1996; Kling y Jakobsen, 1997; Schweiger y Jakobsen, 1998; Schweiger *et al.*, 2001). Por el contrario, Schweiger *et al.* (2001) reportaron una estimulación en la toma de P por las hifas en



combinación con dosis baja de Carbendazim.

## **2.6 Influencia de factores ambientales sobre los efectos de plaguicidas**

Cuando los plaguicidas llegan al suelo, éstos entran en contacto con una variedad de factores que ahí se encuentran, y se establecen interacciones que pueden influir en los efectos de los plaguicidas sobre los organismos del suelo. Por ejemplo, la interacción con la materia orgánica juega un papel importante en la persistencia, movilidad, lixiviación y en la biodisponibilidad de los plaguicidas en el suelo (Weed y Weber, 1974; Khan, 1978; Bollag *et al.*, 1992).

La adsorción de los plaguicidas por la materia orgánica aumenta la retención de éstos en el ambiente del suelo y reduce la cantidad del plaguicida en la solución del suelo y por tanto la interacción con raíces y otros organismos, teniendo influencia el contenido de materia orgánica y la naturaleza de ésta (Weed y Weber, 1974; Bekbölet *et al.*, 1999; Spark y Swift, 2002).

Otros factores como el tipo de suelo y su composición, temperatura, pH y la presencia de raíces pueden afectar la estabilidad y disponibilidad del plaguicida y por tanto, sus impactos sobre otros componentes (Weed y Weber, 1974; Bollag *et al.*, 1992; Cornejo y Jamet, 2000; Földényi *et al.*, 2011). Las interacciones que pueda establecer un plaguicida con otros factores externos también dependen de la estructura química de éste (Khan, 1978; Bollag *et al.*, 1992).

La concentración de nutrientes minerales en el suelo también juegan un papel importante, ya que pueden influir directamente o indirectamente sobre los plaguicidas. Como ejemplo, las moléculas del herbicida glifosato, que contienen un grupo metil-fosfónico, pueden competir con los fosfatos inorgánicos por los sitios de unión a cationes absorbidos en el suelo (De Jonge *et al.*, 2001; Gimsing y Boggaard, 2002; Clua *et al.*, 2012). Además, niveles adecuados de nutrientes en el suelo pueden permitir una mayor presencia de microorganismos, los cuales pueden reducir a los plaguicidas en el ambiente.

Sin embargo, la mayoría de los estudios acerca de este tema se ha realizado sin considerar otros factores ambientales con los que los plaguicidas pueden interactuar en el suelo (Moorman, 1989; Johnsen *et al.*, 2001; Bünemann *et al.*, 2006; Lo, 2010). Dichas interacciones pueden incluso modificar el efecto de los plaguicidas por sí mismos. Por lo tanto, existe la necesidad de estudios que busquen evaluar los efectos de plaguicidas y sus interacciones con otros factores en el suelo, como la disponibilidad de nutrientes y de materia orgánica.

### **3. HIPÓTESIS**

El efecto de los plaguicidas sobre la abundancia microbiana, la transformación del C, N y P en el suelo y el desempeño vegetal está influenciado por la disponibilidad de P mineral y materia orgánica en el suelo.

### **4. OBJETIVOS**

#### ***General***

Evaluar los efectos de las interacciones de los plaguicidas Carbendazim, Glifosato y Carbofurán con materia orgánica y la disponibilidad de P mineral en el suelo sobre los microorganismos del suelo, la transformación del C, N y P, el desempeño vegetal y colonización radical con hongos micorrízicos arbusculares (HMA).

#### ***Particulares***

Evaluar el efecto de la adición de diferentes plaguicidas, materia orgánica y P mineral individualmente y en combinación sobre la actividad de los microorganismos en el suelo sin presencia de plantas.

Evaluar el efecto de diferentes plaguicidas, materia orgánica y P mineral individualmente y en combinación sobre la abundancia microbiana del suelo sin y con presencia de planta de maíz

Evaluar el efecto de diferentes plaguicidas, materia orgánica y P mineral individualmente y en combinación sobre la transformación del C, N y P en el suelo con y sin presencia de planta de maíz

Evaluar el efecto de diferentes plaguicidas, materia orgánica y P mineral individualmente y en combinación sobre el desempeño vegetal de la planta y colonización radical con HMA

## **5. METODOLOGÍA**

El presente proyecto de investigación se realizó a través de dos fases experimentales en las que se evaluaron los efectos de los plaguicidas en los microorganismos del suelo sin y con presencia de plantas de maíz.

### **5.1 Características y muestreo del suelo**

La muestra de suelo para el presente estudio fue recolectada de una parcela agrícola experimental del Centro Regional Universitario Centro Occidente, Universidad Autónoma de Chapingo, (19°41'10'' N, 101°14'19'' O), localizada en Morelia, México. El tipo de suelo es vertisol (INEGI, 1979). Este suelo de textura arcillosa tiene un pH de 7.3, con 2.7% de materia orgánica del suelo (MOS), y concentraciones de P y N inorgánico disponible de 5.8 y 23.2 ppm, respectivamente. Las parcelas han sido cultivadas con monocultivo de maíz por más de 10 años, usando plaguicidas y fertilizantes.

El suelo fue colectada en un cuadrante de 10 x10 m en una parcela experimental de maíz a 20 cm de profundidad. El suelo fue mezclado y tamizado por una malla de 0.84 mm y posteriormente almacenado en contenedores cerrados a temperatura ambiente.

### **5.2 Diseño experimental**

El diseño experimental en ambas fases fue trifactorial completo, donde los factores principales fueron plaguicidas (con 4 niveles: sin aplicación, Carbendazim, Glifosato y Carbofurán), materia orgánica (0 y 0.5% rastrojo de maíz), y fertilización mineral con P (0 y 100 ppm  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) para un total de 16 tratamientos con 4 réplicas cada uno (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diseño experimental de las dos fases de evaluación.

Fases	Factores	Niveles	Total
<b>1. Efecto de plaguicidas en los microorganismos del suelo sin presencia de raíces</b>	Plaguicidas	Sin, Carbendazim, Glifosato y Carbofurán	4
	Materia orgánica	0 and 100 ppm	2
	Fertilización mineral con P	0 y 0.5%	2
	<b>Réplicas</b>		4
	<b>Unidades experimentales</b>		64
<b>2. Efecto de plaguicidas en los microorganismos del suelo con presencia de raíces</b>	Plaguicidas	Sin, Carbendazim, Glifosato y Carbofurán	4
	Materia orgánica	0 and 100 ppm	2
	Fertilización mineral con P	0 y 0.5%	2
	<b>Réplicas</b>		4
	<b>Unidades experimentales</b>		64

### 5.3 Efecto de plaguicidas en los microorganismos del suelo –ensayo sin plantas

#### 5.3.1 Experimento in vitro

El experimento in vitro se realizó a través de un método de incubación aeróbica (Fig. 4). Para cada uno de los 16 tratamientos, 4 réplicas de muestras de 100 g de sustrato no estéril (mezcla de suelo agrícola y arena perlita en proporción 3:1) fueron colocadas en tubos de cloruro de polivinilo (PVC) de 5 cm de diámetro, con una malla de 0.15 mm en uno de los extremos. Las muestras fueron humedecidas con agua desionizada por capilaridad de acuerdo al 80% de capacidad de campo e incubadas en la oscuridad en frascos individuales por 23 días a 26 °C. La humedad del suelo fue ajustada y los frascos aireados periódicamente para evitar condiciones anaeróbicas en las muestras de suelo. En los tratamientos, cada plaguicida, la materia orgánica y el P mineral fueron mezclados con la arena y posteriormente con el suelo por medio de rotación en frascos en las siguientes proporciones: Carbofurán  $1.8 \mu\text{g g}^{-1}$ , Carbendazim  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  y Glifosato  $2.2 \mu\text{g g}^{-1}$ . Fertilización mineral con P como solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0 and 100 ppm). Materia orgánica (0 y 0.5%). La materia

orgánica utilizada fue obtenida a partir de plantas de maíz de la misma parcela experimental de donde se tomó el suelo. Las plantas secas fueron seleccionadas, trituradas y esterilizadas a 120 °C/20 min. Las muestras post-incubación y cuatro muestras pre-incubación (tomadas después de mezclar el suelo) fueron almacenadas a 4 °C para los subsecuentes análisis bioquímicos y biogeoquímicos, y a -2°C para el análisis de ácidos grasos.

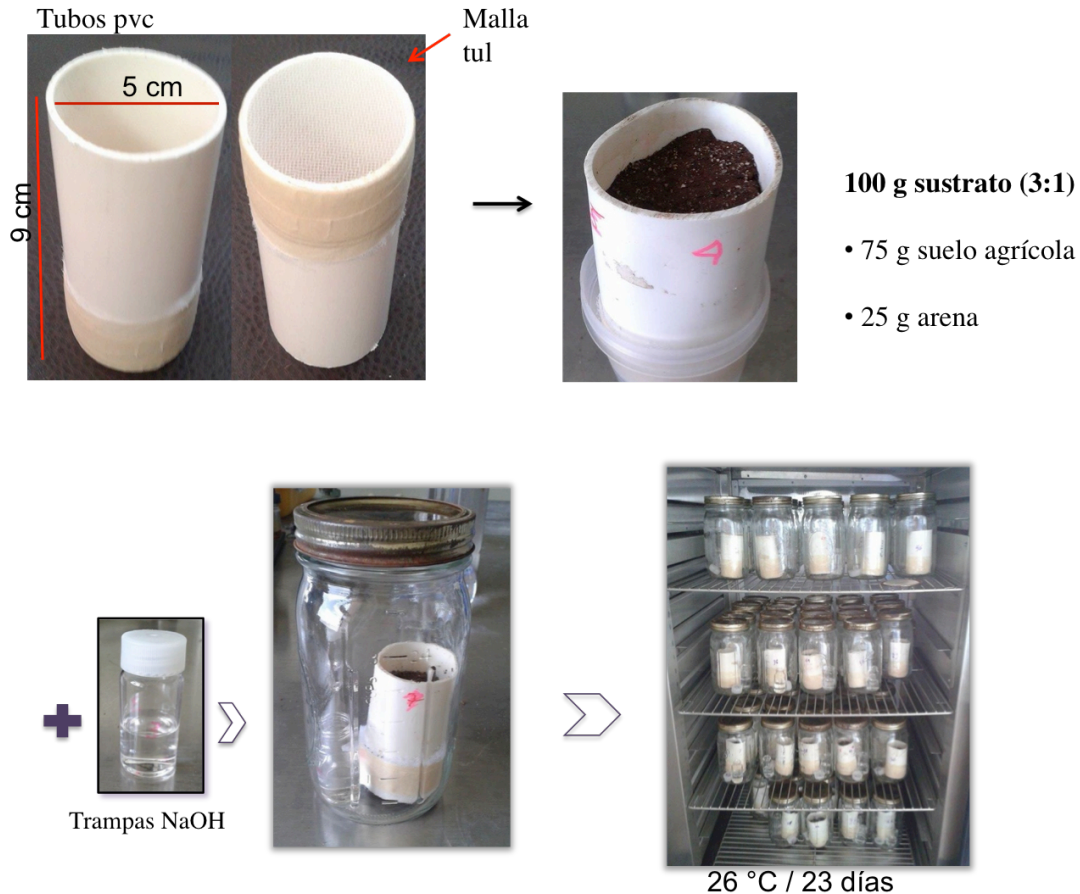


Figura 4. Método de incubación aeróbica del suelo utilizado

### 5.3.2 Determinación de la respiración microbiana

La determinación del  $\text{CO}_2\text{-C}$  emitido se llevó a cabo utilizando trampas con 10 mL de NaOH 1N. Estas trampas fueron reemplazadas a los 1, 3, 6, 9, 13, 17 y 23 días de incubación. Se añadieron 5 mL de  $\text{BaCl}_2$  1.5N en cada trampa para precipitar el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en  $\text{BaCO}_3$  y así

cuantificar el NaOH residual con HCl 1N y fenofaleína como indicador (Fig. 5) (Coleman *et al.*, 1978). La tasa de respiración microbiana fue expresada como  $\text{CO}_2\text{-C}\mu\text{g C g}^{-1} \text{d}^{-1}$ .

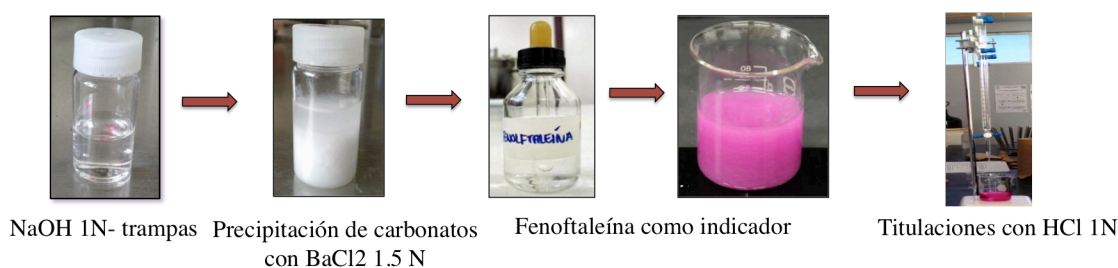


Fig. 5. Proceso para determinar la respiración de los microorganismos del suelo.

### 5.3.3 pH y humedad

Las muestras de suelo fueron secadas en horno a 80 °C por 48 h hasta peso constante para la determinación del contenido de humedad por el método gravimétrico. Por su parte, el pH del suelo fue determinado en agua desionizada (proporción de peso 1:10) con un medidor de pH digital eléctrico (Corning).

### 5.3.4 Análisis de nutrientes en el suelo

Todas las formas de C fueron determinadas usando un Analizador de Carbono Total (IUC Mod. CM 5012; Chicago, E.U.A), y las concentraciones de N y P fueron determinadas por análisis colorimétrico a 660 nm en un Auto Analizador Bran-Luebbe III (Norderstedt, Alemania).

### 5.3.5 Concentración de C, N y P en el rastrojo de maíz

Previo a los análisis de nutrientes, las submuestras fueron secadas en horno a 80 °C y molidas en un Molino Thomas Scientific y tamizados a través de malla 40 (0.425 mm). El C fue determinado por combustión y detección coulométrica (Huffman, 1977). Para la determinación de la concentración de N y P, las muestras fueron mineralizadas a través de digestión con ácido sulfúrico. Una vez digeridas las muestras, el N fue determinado por el método micro-Kjeldahl (Bremmer, 1996) y el P por el método colorimétrico de molibdato después de la reducción con ácido ascórbico (Murphy y Riley, 1962).

### **5.3.6 Nutrientes disponibles en el suelo**

Para determinar las formas de N disponible ( $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ ), se realizaron extracciones de muestras de suelo fresco (2 g) utilizando KCl 2M (Robertson et al., 1999), seguido de filtraciones a través de papel filtro Whatman No.1. Ambas formas fueron determinadas colorimétricamente por el método de fenol-hipoclorito (Technicon 1977). El P inorgánico disponible ( $\text{HPO}_4^-$ ) se extrajo con bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), pH 8.5, y se cuantificó por colorimetría mediante el método de ácido ascórbico-molibdato (Murphy y Riley, 1962).

### **5.3.7 Nutrientes disueltos en el suelo**

Los nutrientes orgánicos disueltos (COD, NOD y POD) fueron extraídos de 20 g de suelo fresco con agua desionizada y agitación por 45 min. El extracto obtenido fue filtrado a través de papel filtro Whatman No. 42 y una membrana de nitrocelulosa de  $0.45 \mu\text{m}$  (Jones y Willett, 2006). Una alícuota del filtrado fue utilizada para determinar el amonio disuelto  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{HPO}_4$  en el extracto de agua desionizada. El carbono total disuelto fue determinado por combustión y detección coulométrica (Huffman, 1977). El nitrógeno total disuelto fue obtenido digiriendo la muestra filtrada y utilizando el método de micro-Kjendahl (Bremner, 1996). El fósforo total disuelto fue también sometido a una digestión ácida y determinado por colorimetría como se explicó anteriormente. Las formas orgánicas disueltas (COD, NOD y POD) fueron calculadas a partir de la diferencia entre las formas totales digeridas y las formas inorgánicas disueltas.

### **5.3.8 Actividad enzimática**

La actividad potencial de tres enzimas,  $\beta$ -1,4-glucosidasa (BG),  $\beta$ -N-acetyl- glucosaminidasa (NAG) y la fosfatasa alcalina (FA), fueron medidas de acuerdo a las técnicas reportadas por Tabatabai y Bremner (1969), Eivazi y Tabatabai (1977; 1988) y Verchot y Borelli (2005). Las actividades fueron determinadas colorimétricamente usando sustratos específicos p-nitrofenol (pNP). Para la extracción enzimática de cada muestra fueron utilizados 2 g de suelo fresco y 30 ml del buffer universal modificado (MUB) a pH de 8. Tres réplicas de 0.67 ml fueron obtenidas del extracto, y se añadieron 0.67 ml del sustrato específico de la enzima. Un control (sin sustrato) por muestra y tres controles de sustrato (sustrato sin muestra) fueron también incluidos por ensayo. Los tubos fueron incubados por 2 h a  $30^\circ\text{C}$  y centrifugados. 0.75 ml del sobrenadante fueron diluidos con 0.075 ml de NaOH 1N y 2 mL de agua desionizada. La medición para la absorbancia de p-nitrofenol (pNP) fue hecha a 410 nm

en un espectrofotómetro (Evolution 201, Thermo Scientific Inc). La actividad coenzimática fue expresada en  $\mu\text{mol pNP g}^{-1} \text{SDW h}^{-1}$ .

### 5.3.9 Abundancia microbiana

Las muestras de suelo fueron previamente liofilizadas y pulverizadas. Posteriormente, se siguió el protocolo de extracción de ácidos grasos totales, el cual consiste en un proceso de cuatro fases: saponificación, metilación, extracción y lavado básico (Fig. 6) (Sasser, 1990).



Fig. 6. Etapas del método de extracción de ácidos grasos, tomado de Wang y Jiang, 2016.



## 5.4 Efecto de plaguicidas en los microorganismos del suelo –ensayo con plantas

### 5.4.1 Experimento en invernadero

El experimento se realizó en macetas con plantas de maíz bajo condiciones de invernadero. Semillas del maíz híbrido DK 2061 fueron colocadas en macetas con 1,500 g de sustrato no estéril (mezcla de suelo agrícola con arena perlita en proporción 3:1) con bajo contenido de P, y se agregó una fertilización mineral completa sin P (Cuadro 2). Las plantas se mantuvieron durante 8 semanas bajo condiciones de invernadero y fueron regadas periódicamente hasta que se alcanzara el 80% de la capacidad de campo. En los tratamientos, cada plaguicida, materia orgánica, y P fueron mezclados con la arena y posteriormente con el suelo por medio de rotación en frascos en las siguientes proporciones: Carbofurán  $1.8 \mu\text{g g}^{-1}$ , Carbendazim  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  y Glifosato  $2.2 \mu\text{g g}^{-1}$ . Fertilización mineral con P como solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0 and 100 ppm) y materia orgánica (0 y 0.5%). La materia orgánica utilizada fue rastrojo de maíz.

Cuadro 2. Macro y micro nutrientes utilizados en la fertilización.

No.	Nutriente	Fórmula	Concentración		Aplicación	
			gr/L	mg/Kg de sustrato	mL de solución/ kg sustrato	mL/800 gr de sustrato (Unidad Experimental)
1	Sulfato de potasio	$\text{K}_2\text{SO}_4$	25	75	3	2.4
2	Nitrato de amonio	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	28.57 (10 mg N/ mL)	86.2	3	2.4
3	Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2$	25	30 de N	3	2.4
5	Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4$ $5\text{H}_2\text{O}$	0.7	2.1	3	2.4
6	Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4$ $7\text{H}_2\text{O}$	1.8	5.4	3	2.4
7	Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4$ $\text{H}_2\text{O}$	3.5	10.5	3	2.4
8	Sulfato de cobalto	$\text{CoSO}_4$ $7\text{H}_2\text{O}$	0.13	0.39	3	2.4
9	Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4$ $7\text{H}_2\text{O}$	15	45	3	2.4
10	Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_2$ $7\text{H}_2\text{O}$	0.06	0.18	3	2.4

#### **5.4.2 Condiciones en el invernadero**

Las plantas fueron crecidas en un invernadero, con cortinas laterales y sistema de ventilación, del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, donde se tuvo un rango aproximado de temperatura de 20-30 °C. Las macetas fueron colocadas en líneas de cuatro repeticiones de cada tratamiento, en bloques por tipo de plaguicida: plaguicida, plaguicida+MO, plaguicida+P, plaguicida+MO+P. Los tratamientos nunca fueron mezclados y se mantuvieron a una distancia considerable para reducir el riesgo de contaminación.

#### **5.4.3 Cosecha**

El experimento fue cosechado transcurridas 8 semanas. Se tomaron muestras de suelo de la zona rizosférica y fueron almacenadas a -20°C para el análisis de ácidos grasos. Las partes aéreas de las plantas fueron cortadas a la superficie del suelo y el suelo adherido a las raíces fue lavado. Dos gramos de raíces fueron separados para evaluar la colonización micorrízica.

#### **5.4.4 Desempeño vegetal**

La clorofila foliar se midió utilizando un medidor de clorofila SPAD-502. La parte aérea y la parte restante de las raíces de las plantas fueron pesadas después de secarlas a 80 °C hasta peso constante.

#### **5.4.5 Colonización micorrízica**

Las muestras de raíces frescas fueron cortadas en segmentos de 1 cm. Posteriormente, las raíces fueron aclaradas en KOH al 10% por 20 min a 90 °C, colocadas en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 20 min a temperatura ambiente y teñidas con azul tripano al 0.05% por 5 min a 90 °C (modificación del método de Phillips y Hayman, 1970). Las raíces teñidas fueron guardadas en frascos de plástico con lactoglicerol. La colonización por hongos micorrízicos arbusculares fue medida de acuerdo al método de Giovannetti y Mosse (1980), el cual está basado en la ausencia-presencia de estructuras micorrízicas en las raíces dentro de las intersecciones en una cuadrícula dibujada en una caja Petri (1x1cm). Las observaciones se realizaron con un microscopio estereoscópico (Marca Olympus SZX7, modelo Micros-AmScope) con aumento 40x.

#### **5.4.6 C, N y P en el tejido vegetal**

Para el análisis de nutrientes en la parte aérea y radical de las plantas, las muestras fueron secadas en horno a 80 °C y molidas en un Molino Thomas ScientiWc de malla 40 (0.425 mm). El C fue determinado por combustión y detección coulométrica (Huffman, 1977). Para la determinación

de las concentraciones de N y P, las muestras fueron digeridas en ácido, a continuación, el N determinado por el método semi-Kjeldahl (Bremmer, 1996) y el P por el método colorimétrico de molibdato después de la reducción con ácido ascórbico (Murphy y Riley, 1962).

Se obtuvo también el contenido total de C, N y P por planta al multiplicar la concentración de cada nutriente obtenida en los análisis de las muestras de raíces y parte aérea por el peso seco de dichas partes de las plantas de maíz.

#### **5.4.7 Abundancia microbiana**

Las muestras de suelo fueron previamente liofilizadas y pulverizadas. Después de lo anterior, se siguió el protocolo de extracción de ácidos grasos totales, el cual consiste en un proceso de cuatro fases: saponificación, metilación, extracción y lavado básico descrito anteriormente (Sasser, 1990).

#### **5.5 Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos en ambas fases fueron analizados utilizando análisis de varianza multifactorial. Cuando el ANOVA indicó efectos significativos, se realizaron comparaciones de medias utilizando el test de comparaciones múltiples de Tukey (von Ende, 1993).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Efecto de plaguicidas en los microorganismos del suelo – Ensayo sin plantas

#### 6.1.1 Nutrientes del rastrojo de maíz

La concentración de C, N y P totales en el rastrojo de maíz fueron las siguientes: 397.7, 77.2 y 10.6 mg g<sup>-1</sup>; mientras que los valores de los cocientes C:N, C:P y N:P fueron: 5.2, 37.5 y 7.3, respectivamente.

#### 6.1.2 Análisis pre-incubación (tiempo cero)

Los resultados de los análisis biogeoquímicos realizados en el suelo antes de las incubaciones mostraron concentraciones de nutrientes y actividad enzimática bajos. El pH del suelo fue de 8.2 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resumen de los resultados biogeoquímicos de los análisis del suelo antes de la incubación (tiempo cero).

Parámetro	Media
pH	8.2
Humedad (%)	5.2%
Carbono orgánico disuelto	39.635 $\mu\text{g g}^{-1}$
Nitrógeno orgánico disuelto	ND
Fósforo orgánico disuelto	ND
PO <sub>4</sub>	2.36 $\mu\text{g g}^{-1}$
NH <sub>4</sub>	2.21 $\mu\text{g g}^{-1}$
NO <sub>3</sub>	1.18 $\mu\text{g g}^{-1}$
Enzima Fosfomonoesterasa	0.1922 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$
Enzima Glucosidasa	0.1524 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$
Enzima NAG	ND

ND: valor menor al límite de detección por el método empleado

### 6.1.3 Análisis post-incubación

Los resultados estadísticos completos de los principales factores y sus interacciones para cada variable medida se presentan en el Cuadro 4. De éstos, se toman de forma individual en una sección para cada variable.

Cuadro 4. Valores de F y y (*p*) del análisis de varianza con plaguicidas (Plag), materia orgánica (MO) y Fósforo (P) como principales factores y su interacción sobre las variables examinadas. \* indica diferencias significativas (\**p*<0.05; \*\**p*<0.01; \*\*\**p*<0.001) que son interpretadas en los resultados.

Parámetro	Fuente de variación						
	Plag	MO	P	Plag*MO	Plag*P	MO*P	Plag*MO*P
<b>B. Gram-negativo</b>	6**	4ns	3ns	0.5ns	5**	2ns	0.5ns
<b>B. Gram-positivo</b>	15***	11**	2ns	1ns	3*	3ns	0.8ns
<b>Hongos saprófitos</b>	16***	29***	8**	0.7ns	8***	0.8ns	2ns
<b>Actinomicetes</b>	5**	2ns	4ns	1ns	5**	0.6ns	1ns
<b>CO<sub>2</sub></b>	314***	4039***	123***	16***	3*	0.7ns	6**
<b>PO<sub>4</sub></b>	56***	18***	1110***	5**	49***	11**	3ns
<b>NH<sub>4</sub></b>	77***	71***	7*	7***	5**	2ns	2ns
<b>NO<sub>3</sub></b>	9***	2ns	9**	2ns	2ns	1ns	0.9ns
<b>COD</b>	12***	19***	3ns	5**	5**	2ns	3*
<b>NOD</b>	8***	4ns	2ns	2ns	5**	2ns	4*
<b>POD</b>	21***	0.9ns	4ns	0.4ns	0.7ns	3ns	1ns
<b>β-Glucosidasa</b>	33***	69***	0.4ns	24***	4*	2ns	2ns
<b>Fosfomonoesterasa</b>	6**	34***	5*	0.5ns	2ns	3ns	0.7ns
<b>NAG</b>	28***	94***	0.2ns	7***	6***	0.8ns	8***
<b>pH</b>	42***	112***	18***	8***	11***	0ns	1ns

### 6.1.4 Abundancia microbiana

En general, la abundancia microbiana incrementó con la adición de materia orgánica (Fig.7). La adición de P también incrementó a los microorganismos, pero este efecto se presentó sólo cuando no se adicionaron plaguicidas (Fig.7). Particularmente, las bacterias Gram-negativas incrementaron con la adición de P, pero con la presencia de plaguicidas este efecto fue inhibido y las bacterias disminuyeron respecto al tratamiento control. Sin adición de P no se observaron efectos significativos (Fig. 7a). Por otro lado, las bacterias Gram-positivas fueron estimuladas por la adición de materia orgánica. Sin P, las poblaciones de bacterias disminuyeron con el plaguicida Carbofurán respecto al Control. Con P adicionado, las poblaciones también disminuyeron con la adición de los tres plaguicidas (Fig. 7 b y c). El mismo patrón fue observado en la abundancia de hongos saprófitos y actinomicetes (Fig. 7 d, e y f).

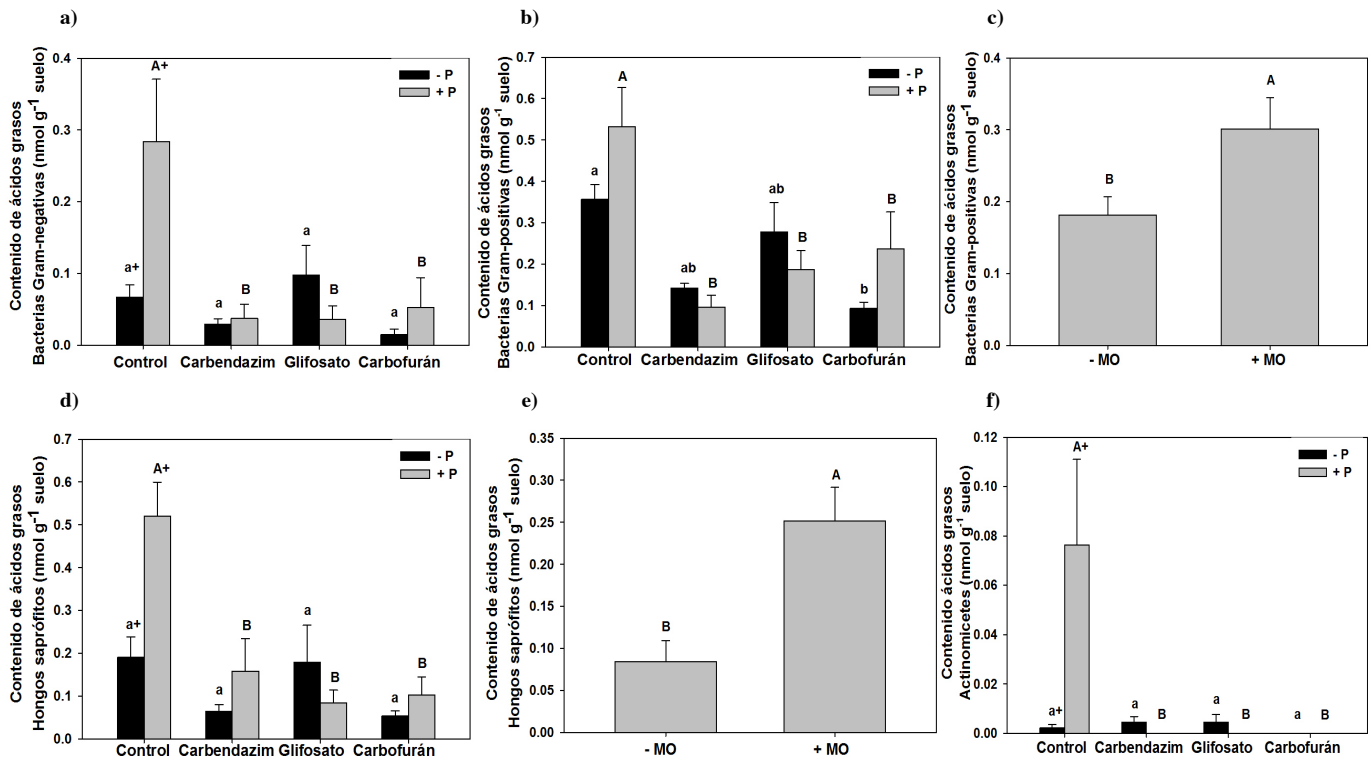


Fig. 7. Abundancia microbiana en el suelo: a) Bacterias Gram-negativas; b) y c) Bacterias Gram-positivas; d) y e) Hongos Saprófitos; f) Actinomicetes. Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes.

### 6.1.5 Respiración microbiana

El efecto de los plaguicidas, materia orgánica, P y la interacción entre estos factores sobre el CO<sub>2</sub>-C emitido acumulado fue significativo (Cuadro 4). La respiración de los microorganismos del suelo fue mayor en los tratamientos con adición de Carbendazim, Glifosato y Carbofurán con un incremento del 186, 167 y 124%, respectivamente. La adición de materia orgánica también incrementó la respiración del suelo, la mayor concentración de CO<sub>2</sub>-C se obtuvo con el plaguicida Glifosato. Con la adición de materia orgánica y P, la respiración se incrementó en los tratamientos con Carbendazim y Carbofurán. Además, los tratamientos de Carbendazim y Glifosato con adición de P, pero sin materia orgánica, tuvieron mayor respiración microbiana que las muestras Control (Fig. 8).

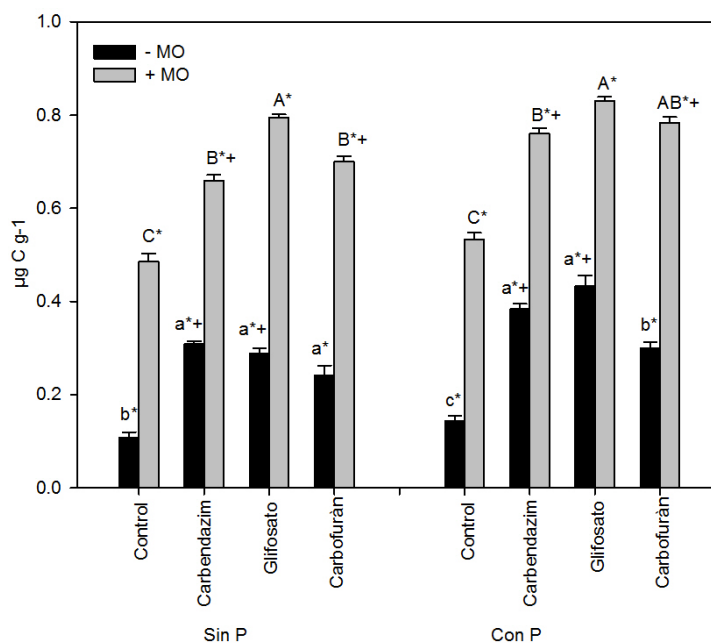


Fig. 8. CO<sub>2</sub>-C total emitido. Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con materia orgánica (+MO) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin materia orgánica (-MO) en cada gráfica. Barras con \* significan que las medias entre tratamientos sin y con materia orgánica son significativamente diferentes. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes.

### 6.1.6 Nutrientes disueltos en el suelo

El efecto de la interacción entre los tres factores sobre el C y N orgánicos disueltos fue significativo (Cuadro 4). Las concentraciones de COD disminuyeron en los tratamientos de Glifosato+P y Carbofurán+P con la adición de materia orgánica comparado a cuando no se adicionó (Fig. 9a). Por otro lado, la mayor concentración de NOD se encontró con la combinación de Carbendazim y materia orgánica. Sin embargo, ésta declinó cuando se agregó P (Fig. 9b). Además, el POD incrementó significativamente por el factor plaguicidas (Cuadro 4); particularmente con el Glifosato (Fig. 9c).

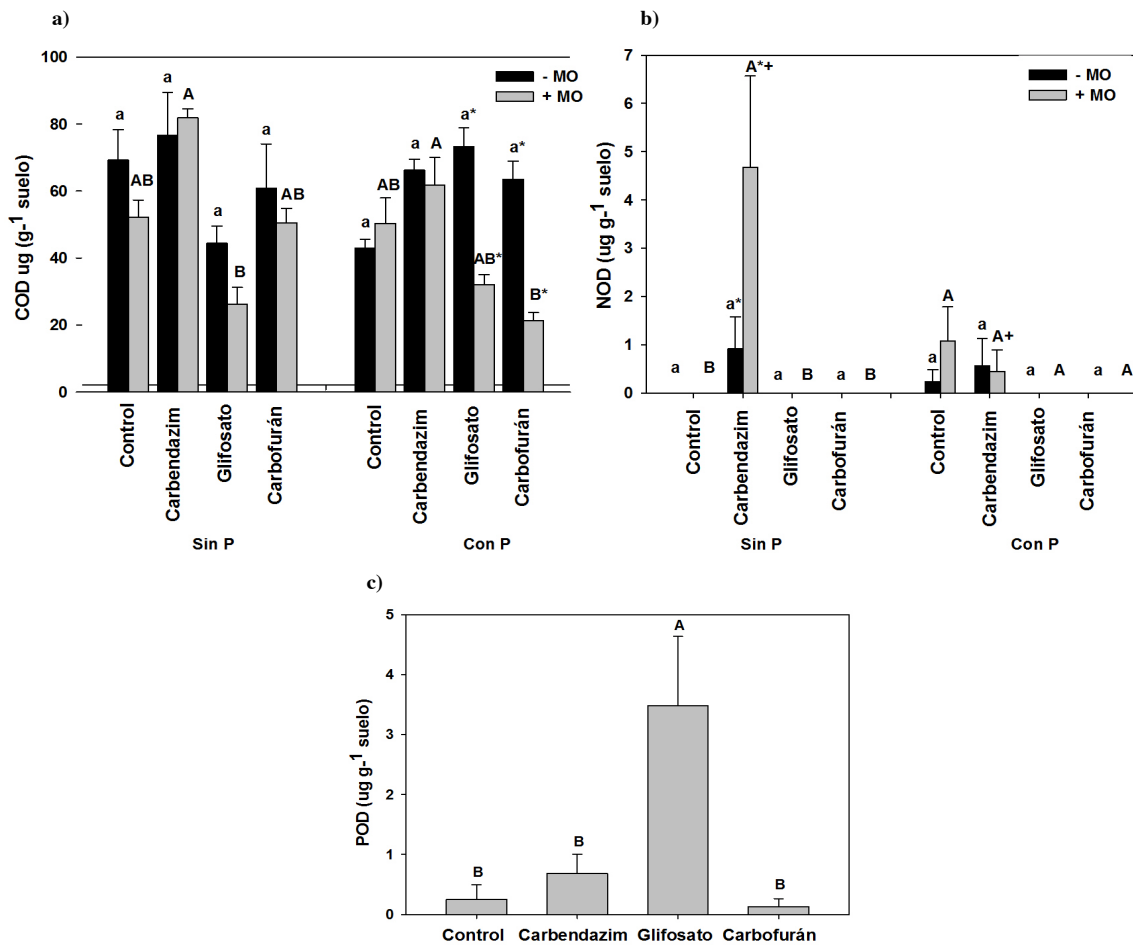


Fig. 9. Nutrientes orgánicos disueltos: a) COD, b) NOD y c) POD. Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con materia orgánica (+MO) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin materia orgánica (-MO) en cada gráfica. Barras con \* significan que las medias entre tratamientos sin y con materia orgánica son significativamente diferentes. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes.



### **6.1.7 Nutrientes disponibles en el suelo**

La interacción entre plaguicidas y materia orgánica, plaguicidas y P, y materia orgánica y P afectaron significativamente la cantidad de P disponible (Cuadro 4). La concentración de  $\text{HPO}_4$  se incrementó con Carbofurán y Glifosato, además los tratamientos con Glifosato tuvieron mayor concentración cuando se agregó materia orgánica respecto a en los que no se adicionó (Fig. 10 a y b). La concentración de  $\text{HPO}_4$  también se incrementó con la adición de P, principalmente con Carbofurán seguido de Glifosato (Fig. 10b), y los tratamientos con adición de P tuvieron así mismo una mayor concentración con la adición de materia orgánica (Fig. 10c). El efecto de las interacciones entre plaguicidas y materia orgánica, y plaguicidas y P sobre el  $\text{NH}_4$  fue significativo (Cuadro 4). La concentración de  $\text{NH}_4$  se incrementó con Glifosato y Carbofurán, en el orden mencionado (Fig. 10 d y e). Al añadir materia orgánica o P, el  $\text{NH}_4$  aumentó en el suelo con los tres plaguicidas, pero principalmente con Glifosato (Fig. 10 d y e). Adicionalmente, el tratamiento Control tuvo menor concentración de  $\text{NH}_4$  cuando se agregó materia orgánica (Fig. 7d). El efecto de los plaguicidas y P sobre la concentración de nitrato en el suelo fue significativo (Cuadro 4). La concentración de  $\text{NO}_3$  disminuyó con los tres plaguicidas; en contraste, ésta se incrementó con la adición de P (Fig. 7 f y g).

### **6.1.8 Actividad enzimática**

El efecto de las interacciones entre plaguicidas y materia orgánica, y plaguicidas y P sobre la  $\beta$ -glucosidasa fueron significativas (Cuadro 4). La actividad de la glucosidasa se incrementó en los tratamientos con Carbendazim y materia orgánica (Fig. 11a). También se observó que el plaguicida Carbendazim estimuló la actividad de esta enzima con y sin la adición de P (Fig. 11b). El efecto de plaguicidas, materia orgánica y P sobre la fosfomonoesterasa fue significativo (Cuadro 4). La actividad de la enzima se incrementó significativamente en los tratamientos con Carbendazim (Fig. 11c). La actividad de esta enzima en el suelo fue también estimulada con la adición de materia orgánica y P (Fig. 11 d y e). El efecto de la interacción entre los tres parámetros sobre la enzima NAG fue significativo (Cuadro 4). Carbendazim y Glifosato en combinación con materia orgánica, incrementaron la actividad de la enzima (Fig. 11f). También se observó que al agregar P al tratamiento con el plaguicida Carbendazim y materia orgánica se incrementó significativamente la actividad de la NAG (Fig. 11f). En contraste, la adición de P al tratamiento con Glifosato y materia orgánica redujo significativamente la actividad de la enzima (Fig. 11f).

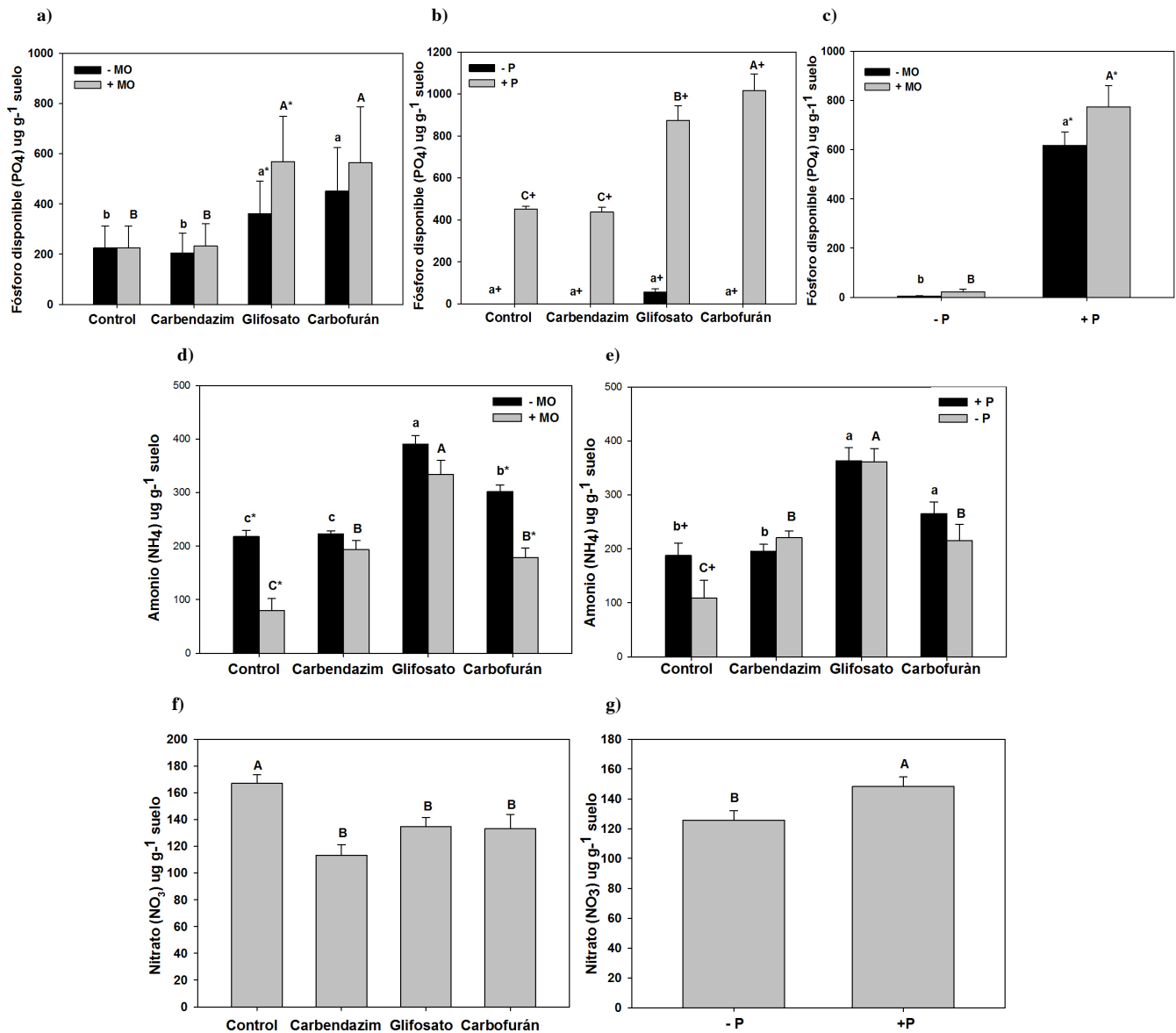


Fig. 10. Nutrientes disponibles: a), b) y c) PO<sub>4</sub>; d) y e) NH<sub>4</sub>; f) y g) NO<sub>3</sub>. Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con materia orgánica (+MO) o fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin materia orgánica (-MO) o fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con \* significan que las medias entre tratamientos sin y con materia orgánica son significativamente diferentes. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes.

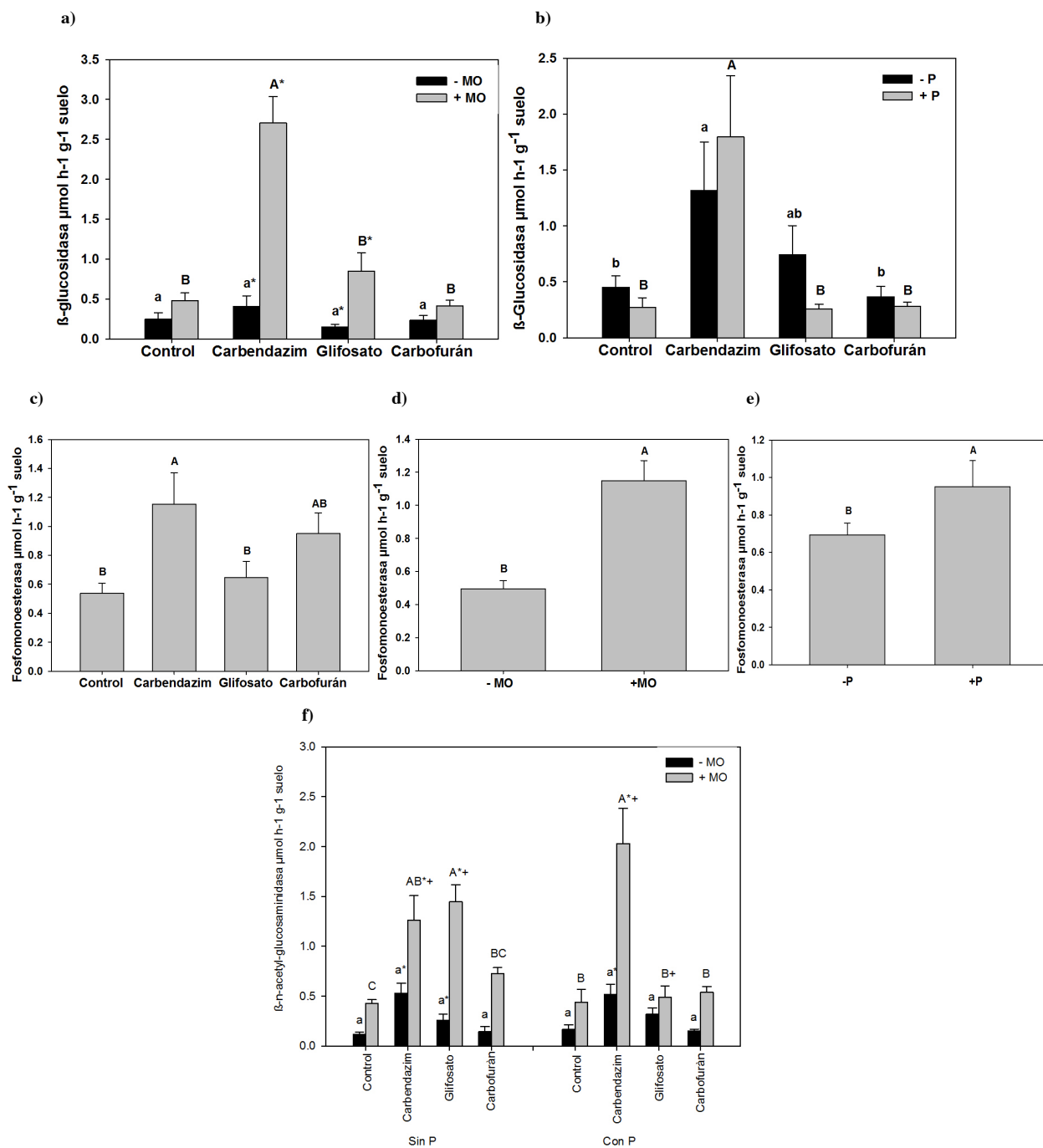


Fig. 11. Actividad enzimática: a) y b) Glucosidasa; c), d) y e) Fosfomonoesterasa; f)  $\beta$ -N-acetylglucosaminidasa (NAG). Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con materia orgánica (+MO) o fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin materia orgánica (-MO) o fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con \* significan que las medias entre tratamientos sin y con materia orgánica son significativamente diferentes. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes.

### 6.1.9 pH

La influencia de las interacciones entre plaguicidas y materia orgánica, y plaguicidas y P sobre el pH fueron significativas (Cuadro 4). Por ejemplo, el suelo tuvo mayor pH cuando Carbofurán fue agregado. Con la adición de materia orgánica o P, el pH fue mayor con los tres plaguicidas respecto al Control. Sin embargo, la materia orgánica indujo una disminución en el pH en comparación a los tratamientos sin materia orgánica, excepto con Carbendazim. Con la adición de P a los tratamientos de Carbofurán, el pH del suelo también disminuyó comparado con los que no lo contenían (Fig. 12).

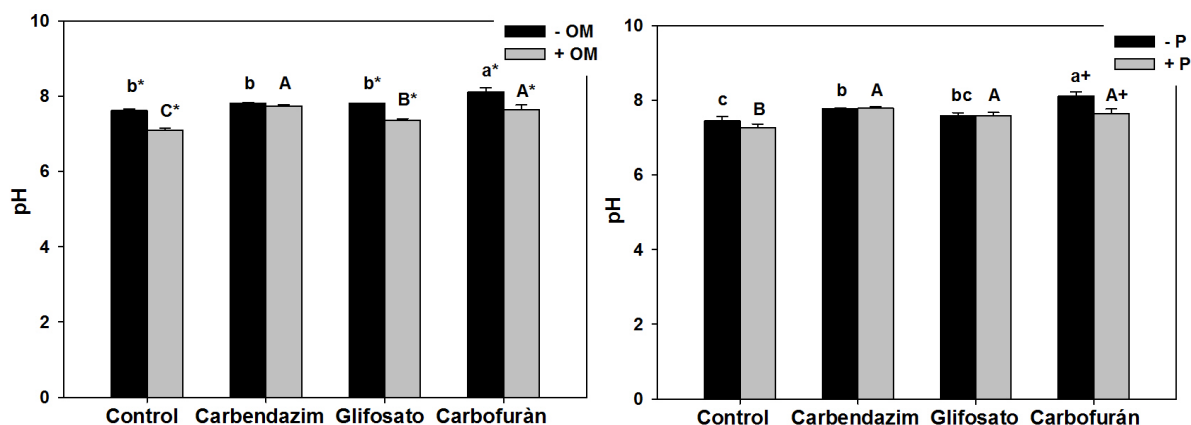


Fig. 12. pH del suelo. Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con materia orgánica (+MO) o fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin materia orgánica (-MO) o fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con \* significan que las medias entre tratamientos sin y con materia orgánica son significativamente diferentes. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes.

### 6.2. Efecto de plaguicidas en los microorganismos del suelo – Ensayo con plantas

Los resultados estadísticos completos de los principales factores y sus interacciones para cada variable medida se presentan en el Cuadro 5. De éstos, se toman de forma individual en una sección para cada variable.

Cuadro 5. Valores de F y y (*p*) del análisis de varianza con plaguicidas (Plag), materia orgánica (MO) y Fósforo (P) como principales factores y su interacción sobre las variables examinadas. \* indica diferencias significativas (\**p*<0.05; \*\**p*<0.01; \*\*\**p*<0.001) que son interpretadas en los resultados.

Parámetro	Fuente de variación						
	Plag	MO	P	Plag*MO	Plag*P	MO*P	Plag*MO*P
<b>B. Gram-Positivo</b>	0.7ns	0.08ns	2ns	2ns	0.3ns	0.9ns	2ns
<b>B. Gram-Negativo</b>	2ns	4*	6*	0.4ns	3*	0.9ns	0.1ns
<b>Hongos saprófitos</b>	1ns	10**	2ns	0.8ns	0.9ns	9**	0.5ns
<b>HMA colonización</b>	239***	6*	72***	3*	25***	10**	3*
<b>HMAextraradical</b>	22***	0.1ns	3ns	2ns	6**	2ns	0.9ns
<b>Peso seco aéreo</b>	43***	2ns	17***	2ns	9***	0.5ns	0.2ns
<b>Peso seco radical</b>	35***	5*	15***	1ns	4**	0.4ns	0.06ns
<b>Clorofila</b>	20***	0.5ns	15***	1ns	12***	0.2ns	0.4ns
<b>C aéreo</b>	3ns	0.04ns	1ns	0.5ns	2ns	1.7ns	0.09ns
<b>N aéreo</b>	41***	2ns	4ns	0.8ns	5**	3ns	0.5ns
<b>P aéreo</b>	18***	0.1ns	0.2ns	0.6ns	4*	3ns	2ns
<b>C raíz</b>	1ns	0.4ns	0.1ns	2ns	0.9ns	0.4ns	0.8ns
<b>N raíz</b>	5**	0.8ns	0.3ns	2ns	6**	0.3ns	2ns
<b>P raíz</b>	5**	0.7ns	0.1ns	1ns	4*	0.3ns	2ns
<b>C total aéreo</b>	38***	2ns	16***	2ns	10***	0.3ns	0.2ns
<b>N total aéreo</b>	40***	0.5ns	4ns	3ns	1ns	1ns	1ns
<b>P total aéreo</b>	33***	3ns	8**	2ns	6***	1ns	1ns
<b>C total raíz</b>	27***	3ns	17***	1ns	4*	1ns	0.4ns
<b>N total raíz</b>	6**	0.005ns	3ns	1ns	6**	0.2ns	3ns
<b>P total raíz</b>	7***	0.4ns	6*	0.6ns	3*	0.1ns	0.8ns

### 6.2.1 Abundancia microbiana

En general, las bacterias Gram-negativas disminuyeron con la adición de materia orgánica, y con Carbofurán con adición de P (Fig. 13 a y b). En contraste, los hongos saprófitos se incrementaron con la adición de P al adicionar la materia orgánica (Fig. 13 c). Las bacterias Gram-positivas no fueron afectadas por estos factores (Cuadro 5).

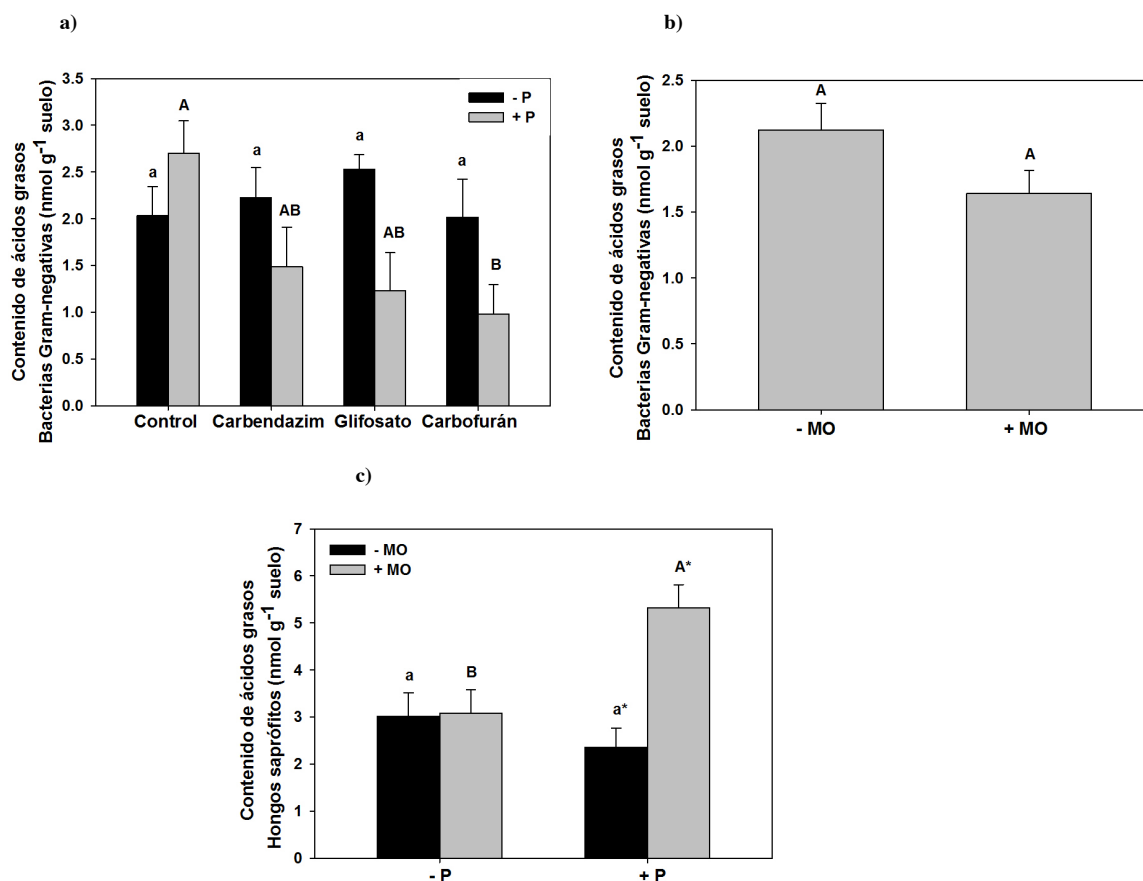


Fig. 13. Abundancia microbiana en el suelo: a) y b) Bacterias Gram-negativo; c) Hongos saprófitos. Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con materia orgánica (+MO) o fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin materia orgánica (-MO) o fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con \* significan que las medias entre tratamientos sin y con materia orgánica son significativamente diferentes. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes.

El porcentaje de colonización micorrízica fue significativamente reducido en los tratamientos con plaguicidas sin y con materia orgánica, y sin y con P, siendo erradicado casi por completo con el fungicida Carbendazim. Adicionalmente, la colonización se incrementó en el tratamiento con

Glifosato cuando se agregó materia orgánica, pero disminuyó cuando se agregó P. La presencia de P en el suelo inhibió la colonización micorrízica, sin y con materia orgánica (Fig. 14a).

Así mismo, la abundancia del micelio extraradical de los HMA disminuyó con la adición de P en el tratamiento Control. Sin la aplicación de P, la abundancia de estos hongos disminuyó con los tres plaguicidas respecto al Control. Con la adición de P, disminuyó solamente con el herbicida Glifosato (Fig. 14b).

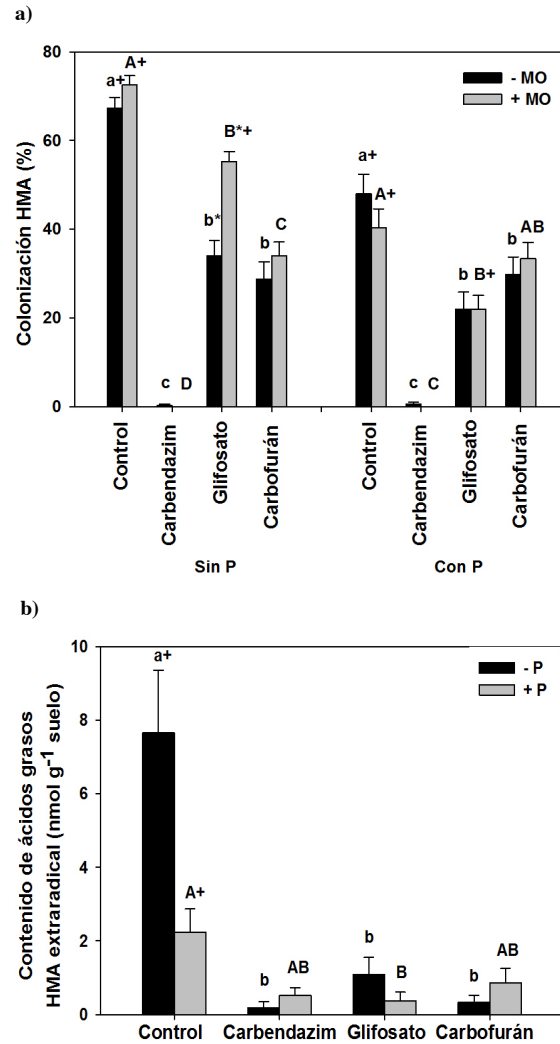


Fig. 14. Colonización de HMA (a) y abundancia de HMA extraradical (b). Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con materia orgánica (+MO) o fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin materia orgánica (-MO) o fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con \* significan que las medias entre tratamientos sin y con materia orgánica son significativamente diferentes. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes.

## 6.2.2 Desempeño vegetal y clorofila

Los tratamientos con el insecticida Carbofurán mostraron el menor peso seco de la parte aérea y radical de las plantas de maíz. En contraste, el peso aéreo y radical se incrementó con el fungicida Carbendazim con la adición de P (Fig. 15; Fig. 16 a y b).

La concentración de clorofila (estimada con unidades SPAD) en las hojas con Carbendazim y Carbofurán sin la adición de P fue menor que en el Control. Sin embargo, cuando se agregó P, la clorofila aumentó en estos tratamientos y no se obtuvieron diferencias entre tratamientos (Fig. 16c).

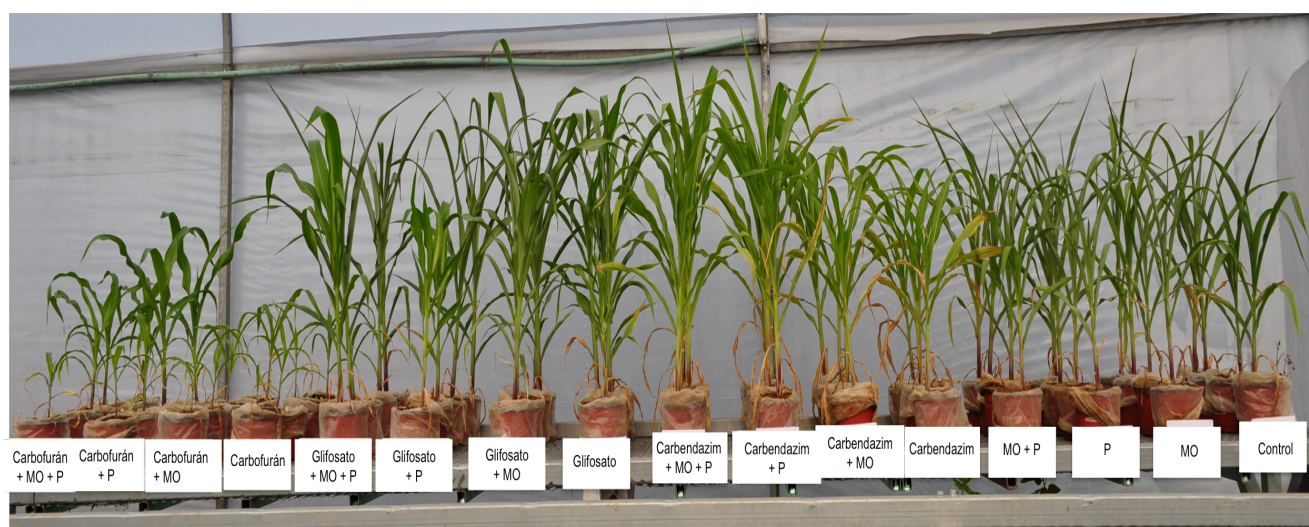


Fig. 15. Plantas de maíz después de 8 semanas de crecimiento bajo los diferentes tratamientos aplicados.



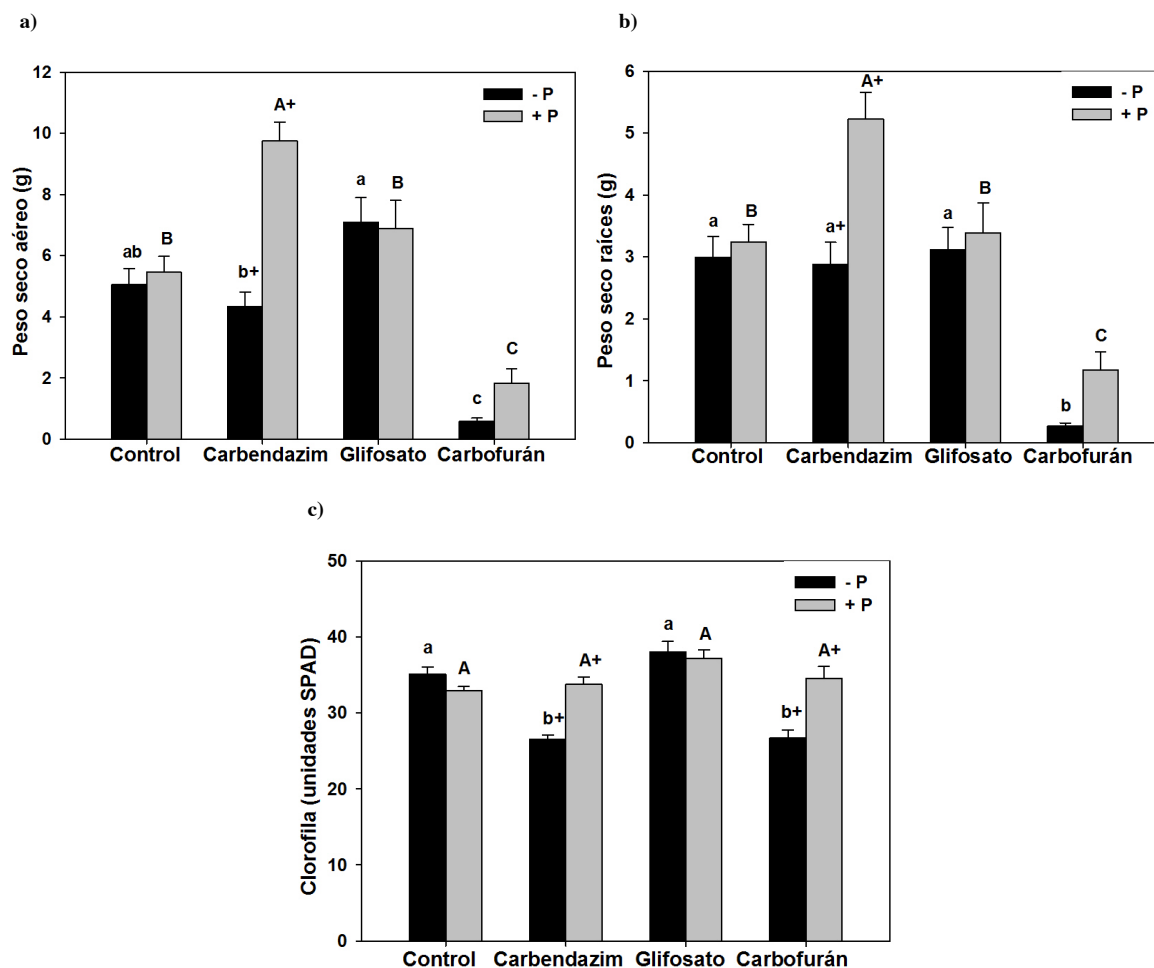


Fig. 16. Peso seco aéreo (a), radical (b) y Clorofila (c) de las plantas de maíz. Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes.

### 6.2.3 Nutrientes en raíces y parte aérea en maíz

El C de la partes aérea y radical de las plantas no fue afectado por ninguno de los factores examinados (Cuadro 5). El N de la parte aérea se incrementó con Glifosato y Carbofurán sin o con P, respecto al Control. Por el contrario, disminuyó en los tratamientos con Carbendazim cuando se agregó P respecto a cuando no se adicionó (Fig. 17a). El N en las raíces se incrementó en los tratamientos con la combinación de Glifosato+P y Carbofurán+ P (Fig. 17b). Por su parte, el P en la

parte aérea aumentó también en dichos tratamientos (Fig. 18a). El P en las raíces disminuyó con la adición de Carbendazim (Fig. 18b).

Respecto a las concentraciones totales de nutrientes por planta, el C en parte aérea y radical se incrementó en los tratamientos con Carbendazim cuando se agregó P y, por el contrario, disminuyó en los tratamientos con Carbofurán (Fig. 19 a y b). La cantidades mayores y menores de N en la parte aérea se encontraron en los tratamientos con Glifosato y Carbofurán respectivamente (Fig. 17c). El N en las raíces sin adición de P, disminuyó con la adición de Carbofurán; con P, se observó un incremento en los tratamientos con Glifosato (Fig. 17d). El P en parte aérea aumentó en los tratamientos con Carbendazim cuando se agregó P. Disminuyó en cambio en los tratamientos con Carbofurán (Fig. 18c), lo cual también se observó en el P de las raíces (Fig. 18d).

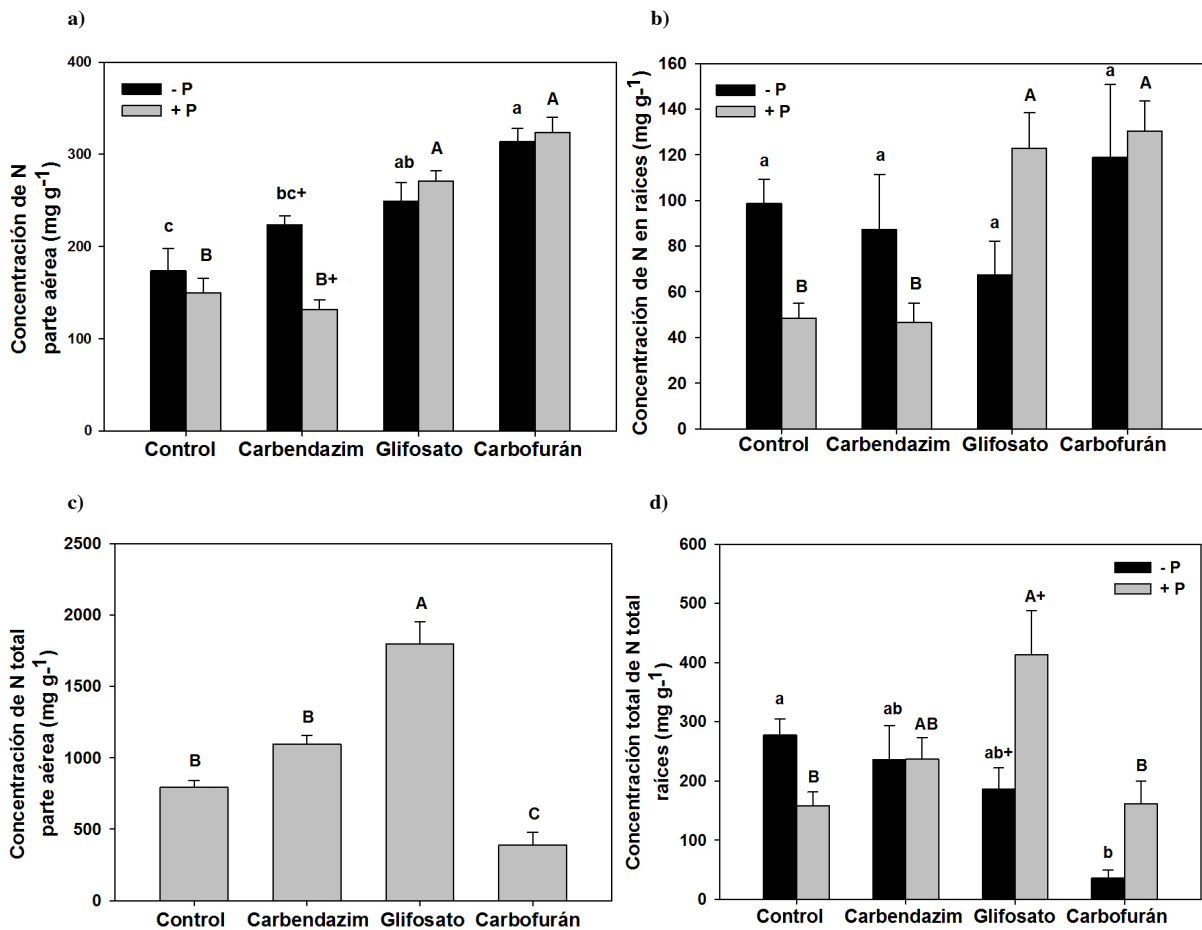


Fig. 17. Concentración de N en parte aérea (a), raíces (b) y N total en parte aérea (c) y raíces (d). Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes.

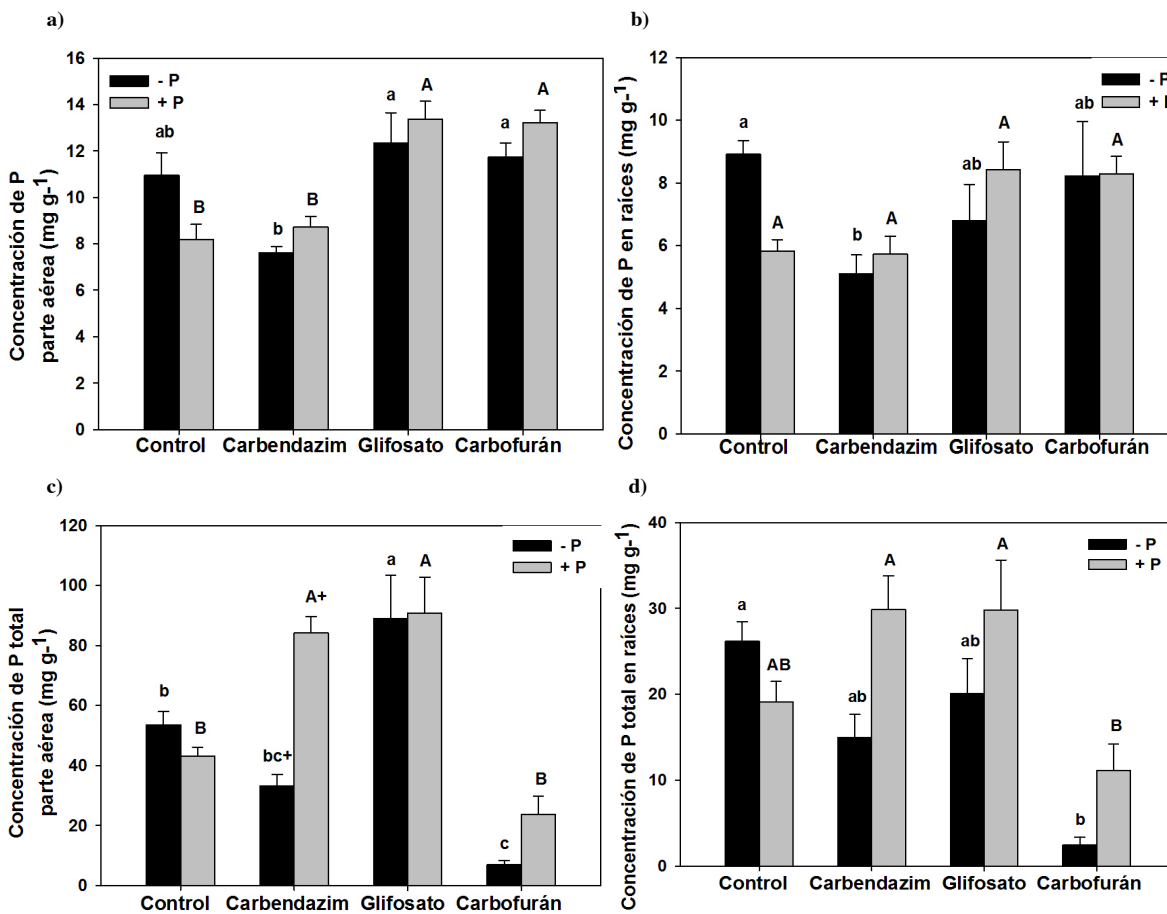


Fig. 18. Concentraciones de P en parte aérea (a), raíces (b) y P total en parte aérea (c) y raíces (d). Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes.

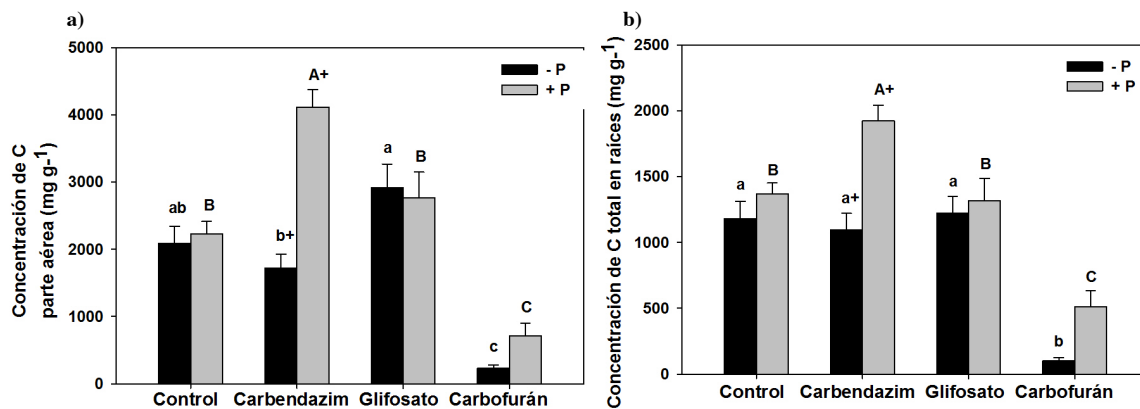


Fig. 19. Concentraciones de C total en parte aérea (a) y raíces (b). Barras con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos con fósforo (+P) en cada gráfica. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos sin fósforo (-P) en cada gráfica. Barras con + significan que las medias entre tratamientos sin y con fósforo (P) son significativamente diferentes.

## 7. DISCUSIÓN

En la mayoría de los estudios sobre los efectos de plaguicidas sobre los microorganismos del suelo, no se han evaluado el efecto de la disponibilidad de fuentes de carbono y nutrientes minerales (Moorman, 1989; Johnsen *et al.*, 2001; Bünemann *et al.*, 2006; Lo, 2010). Por lo anterior, en el presente estudio se examinó la influencia de la materia orgánica y la disponibilidad de P mineral sobre los impactos de tres plaguicidas sobre los microorganismos del suelo, la dinámica del C, N y P y el desempeño vegetal.

### 7.1. Efecto de plaguicidas en los microorganismos del suelo –ensayo sin plantas

#### 7.1.1. Abundancia de los microorganismos del suelo

Los resultados presentados en este trabajo mostraron que la abundancia de bacterias y hongos se incrementó en respuesta a la adición de materia orgánica. Este incremento en la abundancia microbiana se debe a un aumento en la disponibilidad de energía derivada de la descomposición del rastrojo de maíz, dado que éste contiene diversos tipo de moléculas orgánicas, tales como polisacáridos, azúcares simples, aminoácidos, proteínas, fenoles, ceras y otros, los cuáles representan una fuente importante de energía y nutrientes (i.e., C, K, Ca, Mg, N y P) y algunos de estos compuestos son de rápida descomposición (Mann *et al.*, 2002; Blanco-Canqui y Lal, 2009).

Así mismo, la aplicación de P mineral estimuló la abundancia de todos los grupos microbianos examinados, pero con la aplicación de los plaguicidas éstos fueron reducidos. Reducciones de los microorganismos del suelo tras la aplicación de Carbendazim (Wang, *et al.*, 2009a; Wang, *et al.*, 2009b; Yu, *et al.*, 2009; Yan, *et al.*, 2011), Glifosato (Busse, *et al.*, 2001; Zobiolo, *et al.*, 2011; Araújo, *et al.*, 2003) y Carbofurán (Wootton, *et al.*, 1993; Dordevic *et al.*, 1998; Das, *et al.*, 2003) han sido reportadas; sin embargo, algunos de estos trabajos reportan que este efecto es solo temporal y los microorganismos resistentes se recuperan pronto y reemplazan a las especies susceptibles a los plaguicidas. Además, los efectos de los plaguicidas son altamente variables, éstos dependerán de múltiples factores como la dosis aplicada, taxones microbianos, propiedades físicas y químicas del suelo y otros factores ambientales (Moorman, 1989; Johnsen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001).

El efecto de los plaguicidas sobre la reducción de los microorganismos del suelo no fue observado en los tratamientos sin aplicación de P, probablemente porque la comunidad de microorganismos ya se encontraba bajo un efecto de estrés por la limitación de P. Este nutriente representa un componente

esencial para la producción de biomasa y es generalmente considerado el principal factor limitante para la actividad de los microorganismos del suelo (Lajtha y Schlesinger, 1988; Canfield *et al.*, 2005).

### **7.1.2 Actividad de los microorganismos del suelo**

La respiración aeróbica medida como el dióxido de carbono emitido se ha utilizado como un parámetro adecuado para evaluar la actividad microbiológica (Zuconi y Bertoldi, 1987; Vig *et al.*, 1999; Antil *et al.*, 2014). Los resultados de la respiración mostraron que la adición de materia orgánica también incrementó la actividad microbiana en todos los tratamientos, como resultado de la liberación de energía proveniente de su descomposición por los microorganismos en el suelo.

Con la adición de plaguicidas se observaron reducciones significativas en la abundancia microbiana, mientras el CO<sub>2</sub>-C emitido se incrementó, lo cual coincide con Merrington *et al.* (2002), quienes reportan que los fungicidas a base de cobre favorecieron el incremento en la tasa de respiración y la reducción de la abundancia microbiana. Una de las posibles causas de estos resultados, es que los plaguicidas evaluados estresaron a las comunidades de microorganismos en el suelo bajo las condiciones de este experimento, debido a que hay mayor demanda de energía, la cual se deriva principalmente a procesos catabólicos para el mantenimiento celular y mecanismos de defensa, y no a los procesos anabólicos para la producción de biomasa (Killham, 1985; Giller *et al.*, 1998; Schipper and Lee, 2004; Liao y Xie, 2007; Petenello *et al.*, 2014; Mogollón *et al.*, 2015).

Sin embargo, otra posible causa es que los microorganismos resistentes a los plaguicidas posiblemente tuvieron un incremento en su actividad metabólica como resultado de una disminución en la competencia de los microorganismos susceptibles (Uyanöz *et al.*, 2005). De igual manera, los microorganismos tolerantes pudieron utilizar los nutrientes derivados de la muerte de los microorganismos susceptibles, así como de la degradación de los plaguicidas (Pozo *et al.*, 1994; Suyamas y Takagi, 1996; Uyanöz *et al.*, 2005).

Por otro lado, la actividad de las enzimas  $\beta$ -glucosidasa, NAG y fosfomonoesterasa es ampliamente usada como indicador de la demanda de C, N y P respectivamente (Schimel y Weintraub, 2003; Moorhead y Sinsabaugh, 2006; Fanin *et al.*, 2016). En este trabajo se observó que el fungicida Carbendazim promovió la actividad de las tres enzimas evaluadas. Este incremento en la actividad enzimática puede indicar que la comunidad microbiana estuvo sometida a un período de estrés con la aplicación de este plaguicida, dado que los microorganismos pueden aclimatarse a condiciones estresantes a través de la asignación de recursos a los mecanismos de adquisición de nutrientes y no a los vinculados al crecimiento (Tapia-Torres *et al.*, 2015; Schimel *et al.*, 2007), lo que coincide con

los datos de respiración y abundancia microbiana mostrados anteriormente. De esta manera, los microorganismos pudieron asignar más energía a la síntesis de enzimas para la adquisición de nutrientes, ya que la síntesis y liberación de éstas responde a señales ambientales y disponibilidad de recursos en el suelo (Sinsabaugh, 2009; Fanin *et al.*, 2016). Además, la liberación de las enzimas al suelo también puede darse a través de la lisis celular (Sinsabaugh, 2009). Sin embargo, y dado que este incremento en la actividad enzimática no se ve reflejado en la concentración de C, N y P obtenidas, la eficiencia de las enzimas pudo disminuir o los nutrientes pudieron ser inmovilizados.

### **7.1.3 Nutrientes en el suelo (transformaciones del C, N y P)**

Los tratamientos con Glifosato y Carbofurán presentaron mayor mineralización, ya que se encontraron mayores concentraciones de nutrientes minerales en el suelo con estos plaguicidas, debido probablemente a la mineralización de los mismos. Se ha reportado que la actividad microbiana es la primera vía de degradación del Glifosato, degradándolo rápidamente a agua, dióxido de carbono y fosfato inorgánico, dejando una fuente de P disponible en el suelo (Torstensson, 1985; Forlani *et al.*, 1999). Los microorganismos están también implicados en la degradación de Carbofurán, ya que una variedad de bacterias pertenecientes a varios taxones son capaces de usarlo como fuente de C y N (Ogram *et al.*, 2000; Mohanta, *et al.*, 2012). Este efecto de incremento en la mineralización por parte de Glifosato y Carbofurán fue también influenciado por la materia orgánica y el P, ya que al agregarlos posiblemente se estimuló aún más la mineralización de C y P en estos tratamientos.

Los tratamientos con Carbendazim y materia orgánica tuvieron significativamente más N orgánico, pero no significativamente más en la parte mineral ( $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3$ ), lo que sugiere que la mineralización disminuyó. Este efecto podría deberse a que el fungicida Carbendazim inhibe a los hongos, quienes son importantes en la descomposición de la materia orgánica (Beare, 1997; McGuire *et al.*, 2010). Con la adición de P, la mineralización probablemente aumentó porque se incrementaron los microorganismos tolerantes al Carbendazim, dado que el P es un nutriente limitante.

Adicionalmente, los resultados sugieren que los tres plaguicidas tuvieron un efecto negativo sobre la nitrificación. Reducciones en la nitrificación a causa de plaguicidas han sido reportadas en otros estudios (Tu, 1994; Vink y Van Straalen, 1999; Srinivasulu *et al.*, 2012). En varios trabajos se ha reportado que la nitrificación es sensible a los plaguicidas y otros químicos, debido probablemente al efecto deletéreo sobre los microorganismos que participan en este proceso (Pell *et al.*, 1998; Gopal *et al.*, 2007; Jacobsen y Hjelmsø, 2014).

## 7.2 Efecto de plaguicidas en los microorganismos del suelo –ensayo con plantas

El presente estudio proporciona una evaluación de los efectos potenciales de las interacciones entre plaguicidas con materia orgánica y la disponibilidad de P mineral sobre los microorganismos del suelo, el desempeño vegetal y la colonización de raíces por HMA. Se encontró que estas variables fueron fuertemente afectadas bajo estos tratamientos, mostrando que los impactos de los plaguicidas fueron influenciados principalmente por la disponibilidad de P y el plaguicida en cuestión.

Los hongos saprófitos se incrementaron con la combinación de materia orgánica y P mineral debido a la degradación del sustrato orgánico y a la disponibilidad de nutrientes (Wild, 1992; McGuire *et al.*, 2010). Estos hongos y las bacterias Gram-positivas reflejaron una mayor tolerancia al no ser afectados por la aplicación de plaguicidas.

Las plantas de maíz tuvieron un menor desempeño vegetal cuando se agregó Carbofurán, lo que sugiere que el insecticida tuvo un efecto fitotóxico. Estos resultados coinciden con Veeraswamy *et al.* (1993), quienes observaron una inhibición en el crecimiento del sorgo después de la aplicación del Carbofurán. Tiyagi *et al.* (2004) encontraron también un efecto fitotóxico a dosis mayores de las recomendadas para su aplicación. Este efecto de toxicidad química podría alterar actividades fisiológicas (fotosíntesis, respiración, producción de hormonas, crecimiento, etc), afectando de esta forma el crecimiento de las plantas.

Así mismo, los HMA fueron afectados por los plaguicidas más que cualquier otra variable medida en este estudio. Los hongos micorrízicos fueron negativamente afectados con la adición de los tres plaguicidas, siendo casi completamente erradicados con Carbendazim. Inhibiciones en la colonización y desarrollo de los HMA por el insecticida Carbofurán han sido reportadas por varios trabajos (Backman y Clark, 1977; Sreenivasa y Baguaraj, 1989; Veeraswamy *et al.*, 1993; Venkateswarli *et al.*, 1994). De igual manera, existen estudios donde se ha observado que el herbicida Glifosato reduce la viabilidad de esporas y la colonización de las raíces (Druille, *et al.*, 2013a; Druille *et al.*, 2013b; Carvalho, *et al.*, 2014 ). Por otra parte, la supresión del desarrollo de los HMA y la toma y transporte de P, causado por el fungicida Carbendazim también ha sido reportada (Sreenivasa y Baguaraj, 1989; Larsen *et al.*, 1996; Kling y Jakobsen, 1997; Schweiger y Jakobsen, 1998; Schweiger *et al.*, 2001), lo cual cobra una vital importancia debido a la importante función que las micorrizas tienen en la nutrición vegetal. Además, el micelio extraradicular de los HMA recibió



un mayor impacto que la colonización radicular, probablemente porque se encuentra expuesto y no protegido en el interior de las raíces.

Por otro lado, la colonización micorrízica y el micelio extraradicular disminuyeron bajo condiciones con mayor disponibilidad de P. Al respecto, la disponibilidad de P en el suelo es uno de los factores edáficos más importantes que reducen la actividad de la micorriza arbuscular (Mosse, 1973; Treseder, 2001; King *et al.*, 2002), al disminuir la colonización de raíces por los HMA (Mosse y Phillips, 1971; Menge *et al.*, 1978; Treseder, 2001). Esto es esperado, ya que ante suficiencia de P, las plantas pueden disponer de los hidratos de carbono asignándolos a otras funciones y no invertirlos en mantener la relación micorrízica (Graham y Eissenstat, 1994; Graham y Eissenstat, 1998; Jifon *et al.*, 2002).

De manera interesante, fue observada una estimulación del crecimiento vegetal en las plantas al combinar Carbendazim y P, lo que coincide con la completa eliminación de la asociación micorrízica. En paralelo fue observado que, aunque hay colonización micorrízica en las raíces de las plantas, hay una mínima cantidad de micelio extraradical en el suelo. Esto sugiere que hubo una posible depresión del crecimiento de las plantas colonizadas por los HMA cuando el P era altamente disponible, lo que probablemente se deba a que estos hongos pueden actuar como parásitos, requiriendo de carbohidratos de la planta hospedera sin beneficiarla con la toma de nutrientes del suelo como lo sugieren Graham y Eissenstat (1994 y 1998).

Por su parte, Carbendazim mitigó la reducción del crecimiento causado por la asociación micorrízica cuando el P no era un limitante, al suprimir completamente a los HMA, reduciendo los costos de carbono de la colonización de raíces para la planta hospedera. Depresiones en el crecimiento de plantas colonizadas por HMA a niveles altos de P en el suelo han sido reportadas en otros estudios (Son y Smith, 1988; Peng *et al.*, 1993; Valentine *et al.*, 2001) y el requerimiento de carbono a la planta por parte de los HMA ha sido sugerido como la causa de estas depresiones (Peng *et al.*, 1993; Graham *et al.*, 1997; Jifon *et al.*, 2002), dado que las estimaciones de la cantidad de carbono que se asigna a las micorrizas van del 4 al 20% del total de carbono de la planta (Graham, 2000). Graham y Eissenstat (1998), obtuvieron una mayor tasa de crecimiento de *Citrus sinensis* al limitar la colonización micorrízica con la aplicación del fungicida Benomil, también atribuida a la reducción de los costos de la colonización de raíces con un suministro alto de P.

## 8. CONCLUSIONES

En este trabajo, los plaguicidas examinados afectaron fuertemente la abundancia y actividad de la comunidad de microorganismos en el suelo, así como la transformación de C, N y P en el suelo y al desempeño vegetal del maíz. Este impacto depende de la presencia de materia orgánica y la disponibilidad de fósforo, el grupo de microorganismos y el plaguicida en cuestión.

De manera específica, en el presente trabajo se encontró que:

Los tres plaguicidas redujeron significativamente la abundancia de los microorganismos en el suelo y aumentaron su actividad sin presencia de la planta. Esto se debió al estrés al que fueron sometidos tras la adición de los químicos y/o al incremento de la actividad de la parte remanente de la comunidad microbiana del suelo.

Los plaguicidas Glifosato y Carbofurán estimularon la mineralización en el suelo, habiéndose potencializado dicho efecto al añadir de materia orgánica y el P.

Todos los plaguicidas evaluados afectaron negativamente la nitrificación en el suelo, debido probablemente a su efecto deletéreo sobre los microorganismos del suelo.

En el ensayo con presencia de plantas, los efectos de los plaguicidas sobre los microorganismos del suelo y el desempeño vegetal estuvieron influenciados principalmente por la disponibilidad de P. A mayor disponibilidad de este nutriente, menor colonización micorrízica intra y extraradical; por otra parte, los hongos saprófitos y el crecimiento vegetal (este último en combinación con Carbendazim) se incrementaron.

El insecticida Carbofurán presentó un efectos fitotóxicos sobre las plantas de maíz, esto se debió, propablemente, a que la dosis utilizada fue mayor a la recomendada.

Los hongos micorrízicos arbusculares se mostraron sumamente sensibles a la adición de los plaguicidas, al ser reducidos significativamente.

El crecimiento vegetal del maíz se estimuló al eliminar la colonización micorrízica con la aplicación del fungicida Carbendazim, cuando el P no fue un nutriente limitante. Esto debido probablemente a que los HMA representaban un costo energético para la planta sin beneficiarla con la toma de nutrientes del suelo.

## 9. PERSPECTIVAS

En la presente investigación se han mostrado varios efectos adversos de los plaguicidas evaluados sobre los microorganismos del suelo y sus actividades. Aún cuando estos agroquímicos tienen un gran potencial benéfico para la productividad agrícola, su uso debe ser evaluado cuidadosamente, considerando los beneficios y perjuicios que puedan resultar en cada caso.

Existen otras medidas para el manejo de plagas y enfermedades que permiten obtener el control de éstas sin el efecto nocivo del uso de plaguicidas. Entre estas alternativas se encuentra el control biológico, el cual se vale de la introducción de microorganismos antagonistas cuya eficacia ha sido mostrada en diferentes cultivos en diversos estudios. El manejo de la agro-biodiversidad inter e intra específica de los cultivos y además de especies acompañantes y espontáneas, para generar hábitats que puedan retener a las especies benéficas y la diversificación de estructuras vegetales aéreas y subterráneas. También es crucial el conocimiento de cada cultivo: las diferentes variedades, las etapas de desarrollo más susceptibles al ataque de plagas y enfermedades, el manejo de la fertilidad y humedad del suelo, etc..

La aplicación de un manejo integral, incluyendo las alternativas ya mencionadas y otras más, y un uso racional de plaguicidas, representa una opción que disminuye la dependencia a los químicos y que puede permitir una agricultura más sostenible. Modelo cuyo principal objetivo es abastecer las necesidades alimentarias de la población no impactando negativamente al ambiente.

Los resultados de este trabajo reflejan la complejidad de los efectos de los plaguicidas sobre la comunidad microbiana del suelo y el desempeño vegetal. Se resalta de esta manera la necesidad de analizar también los efectos de las interacciones de estos agroquímicos con la cantidad de materia orgánica y la disponibilidad de P en el suelo sobre la comunidad microbiana y las plantas. Otra gran cantidad de factores en el suelo, como el nivel de N y humedad, pueden estar influenciando también de manera considerable los efectos de diferentes tipos de plaguicidas y la respuesta de diferentes procesos microbianos. Debido a lo anterior, deben ser realizados en el futuro otros estudios que evalúen los efectos de diferentes variables ambientales sobre el impacto de los plaguicidas en el suelo. Así mismo, otros ecosistemas como son los sistemas acuáticos deberían ser investigados en el mismo sentido.

## 10. LITERATURA CITADA

- Ahmed, S. y Ahmad, M. S. 2006. Effect of Insecticides on the total number of soil bacteria under laboratory and field conditions, *Pak. Entomol.* 28:63-67
- Aktar, M.W., Sengupta, D. y Chowdhury, A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* 2:1-12.
- Alatorre, R., Bravo, H., Leyva, J. y Huerta, A. 2000. Manejo Integrado de Plagas. México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Subsecretaría de Desarrollo Rural y Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural.
- Albert L.A. 2005. Panorama de los plaguicidas en México. *Rev. Toxicol.* 8:1-17.
- Albert L.A. y Benítez J.A. 2005. Impacto ambiental de los plaguicidas en los ecosistemas costeros. En A.V. Botello, J. Rendón–von Osten, G. Gold–Bouchot y C. Agraz–Hernández (Ed.), Golfo de México: Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias (pp. 157-176). México: Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ecología.
- Amrhein, N., Deus, B., Gehrke, P., y Steinrücken, H.C. 1980. The site of the inhibition of the Shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiol.* 66:830-834.
- Anderson, R.L. 1989. Toxicity of synthetic pyrethroids to freshwater invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8:403-410.
- Antil, R.S., Raj, D., Abdalla, N. y Inubushi, K. 2014. Physical, Chemical and Biological Parameters for Compost Maturity Assessment: A Review. *Composting for Sustainable Agriculture*. Springer 83-101.
- Araújo, A.S.F., Monteiro, R.T.R. y Abarkeli, R.B. 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52:799–804.
- Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J.C. y García-Río, L. 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture Ecosystems & Environment* 123: 247-260.
- Backman, P.A. y Clark, E.M. 1977. Effect of carbofuran and other pesticides on vesicular-arbuscular mycorrhizae in peanuts. *Nematropica* 7:13-17
- Bardgett, R.D. 2005. *The Biology of Soil: A Community and Ecosystem Approach*. New York: Oxford University Press.
- Beare, M.H., 1997. Fungal and bacterial pathways of organic matter decomposition and nitrogen mineralization in arable soil. En: L. Brussaard y R. Ferrera-Cerrato (Ed.), *Soil Ecology in Sustainable Agricultural Systems, Advances in Agroecology*. CRC Press/Lewis Publishers.
- Bekbölet, M., Yenigun, O. y Yucel, I. 1999. Sorption studies of 2,4-D on selected soils. *Water Air Soil Pollut.* 111:75 –88.

- Bending, G.D., Lincoln, S.D., Edmondson, R.N. 2006. Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties. *Environ Pollut.* 139:279–287.
- Bennicelli, R.P., Szafranek-Nakonieczna, A., Wolinska, A., Stepniewska, Z. y Bogudzinska, M. 2009. Influence of pesticide (glyphosate) on dehydrogenase activity, pH, Eh and gases production in soil (laboratory conditions). *International Agrophysics* 23:117–122.
- Bentley, R. 1990. The shikimate pathway-a metabolic tree with many branches. *Critical Reviews in Biochemistry & Molecular Biology* 25:307-384.
- Berg, G., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R. Y Smalla, K. 2005. Impact of plant specie and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4203-4213.
- Bethlenfalvay, G.J. y Linderman, R.G. 1992. Preface. En G.J. Bethlenfalvay y R. G. Linderman (Ed.), *Mycorrhizae in sustainable agricultura* (pp. 45-70). Madison, Wisconsin, USA: ASA Special Publication Number 54.
- Blanco-Canqui, H. and Lal, R. 2009. Corn stover removal for expanded uses reduces soil fertility and structural stability. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 73:418-426.
- Blanco, F. A. y Salas, E. A. 1997. Micorrizas en la agricultura: Contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 21:55-67.
- Bollag, J.M. 1992. Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. *Sci Total Environ.* 123-124:205-217.
- Brechelt, A. 2004. *El Manejo Ecológico de Plagas y Enfermedades*. Santiago de Chile. Chile: Fundación Agricultura y Medio Ambiente (FAMA)-Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAP-AL).
- Bremner, J.M., 1996. Nitrogen-Total. In: Spark, D.L., Page, A.L., Summer, M.E., Tabatabai, M.A., Helmke, P.A. (Eds). *Methods of Soil Analyses Part 3: Chemical Analyses*. Soil Science Society of America, Madison WI; pp. 1085-1121.
- Bünemann, E.K., Schwenke, G.D. y Van Zwieten, L. 2006. Impact of agricultural inputs on soil organisms-a review. *Aust J Soil Res.* 44:379-406.
- Burger, M. y Fernández, S. 2004. Exposición al herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos. *Revista Médica del Uruguay* 20: 202-207.
- Burrows, L.A. y Edwards, C.A. 2004. The use of integrated soil microcosms to assess the impact of carbendazim on soil ecosystems. *Ecotoxicology* 13:143–161.
- Busse, M.D., Ratcliff, A.W., Shestak, C.J. y Powers, R.F. 2001. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1777–1789.

- Canfield, D.E, Thamdrup, B., and Kristensen, E. 2005. The global phosphorus cycle. En A.J. Southward, P.A. Tyler, C.M. Young, L.A. Fuiman (Eds.), *Advances in marine biology* vol 48 (pp. 419-440). Londres: Elsevier Academic Press.
- Cano, M. A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 14: 15 – 31.
- Carlisle, S.M. y Trevors, J.T. 1988. Glyphosate in the environment. *Water, Air, and Soil Pollution* 39:409-420.
- Carvalho, F.P, Souza, B.P., França, A.C., Ferreira, E.A., Franco, M.H.R., Kasuya, M.C.M. y Ferreira, F.A. 2014. Planta Daninha, Viçosa-MG 32:783-789.
- Chen, S.K., Subler, S. and Edwards, C.A. 2001. Effects of benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biol. Biochem.* 33:1971-80.
- Chiba M. y Veres, D.F. (1980). HPLC method for simultaneous determination of residual benomyl and methyl-2-benzimidazole carbamate in apple foliage without cleanup. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63:1291-1295.
- Clua, A., Conti, M. y Beltrano, J. 2012. The effects of Glyphosate on the growth of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and its interaction with different phosphorus contents in soil. *Journal of Agricultural Science* 4:208-218.
- Coleman, D.C., Anderson, R.V., Cole, C.V., Elliott, E.T., Woods, L. and Campion, M.K., 1978. Trophic interactions in soils as they affect energy and nutrient dynamics. IV. Flows of metabolic and biomass carbon. *Microb. Ecol.* 4:373-380.
- Comisión federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). 2012. Registros de plaguicidas autorizados por categoría toxicológica. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/as/documents/registrosanitariomedicamentos/regplag.pdf>
- Comisión federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). 2015. Plaguicidas. Recuperado el 19 de agosto de 2016, en <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/PlaguicidasYFertilizantes.aspx>.
- Contreras-Araneda, P.A. 2005. Suelos Contaminados con Hidrocarburos: RNA 16S como Indicador de Impacto. Tesis Ingeniero Civil en Biotecnología. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología.
- Cornejo, J. y Jamet, P. 2000. Pesticide/Soil interactions-some current research methods. París, Francia: Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).
- Das, A.C. y Mukherjee, D. 1998. Insecticidal effects on soil microorganisms and their biochemical processes related to soil fertility. *World J. Microbio.* 14(6): 903-906.
- Das, A.C. y Mukherjee, D. 2000. Soil application of insecticides influences microorganisms and plant nutrients. *Applied Soil Ecology* 14:55-62.

- Das, A.C., Chakravarty, A., Sukul, P. y Mukherjee, D. 2003. Influence and persistence of phorate and carbofuran insecticides on microorganisms in rice field. *Chemosphere*. 53:1033–1037.
- De Jonge, H., de Jonge, L. W., Jacobsen, O. H., Yamaguchi, T., y Moldrup, P. 2001. Glyphosate sorption in soils of different pH and phosphorus content. *Soil Science*, 166:230–238.
- De La Torre, P., Astudillo-Saavedra, L., Caballero, J., Quiroga, J., Alzate-Morales, J. H., Cabrera, M. G. y Trilleras, J. 2012. A novel class of selective acetylcholinesterase inhibitors: synthesis and evaluation of (E)-2-(benzo[d]thiazol-2-yl)-3-heteroarylacrylonitriles. *Molecules* 17:12072-12085.
- Dordevic, S., Sestovic, M., Raicevic, V. y Dordevic, A. 1998. Fluctuation of the abundance of microorganisms in the carbofuran treated soil. *Pest*. 13(4): 281-288.
- Druille, M., Cabello, M.N., Omacini, M. y Golluscio, R.A. 2013a. Glyphosate reduces spore viability and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology* 64:99–103.
- Druille, M., Omacini, M., Golluscio, R.A. y Cabello, M.N. 2013b. Arbuscular mycorrhizal fungi are directly and indirectly affected by glyphosate application. *Applied Soil Ecology* 72:143– 149.
- Duke, S.O., y Powles, S.B. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* 64:319–325.
- Eivazi, F. and Tabatabai, M.A. 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 9:167-172.
- Eivazi, F. and Tabatabai, M.A. 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 20:601-606.
- Fang H., Wang, Y., Gao, C., Yan, H, Dong, B. y Yu, Y. 2010. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. CBW capable of degrading carbendazim. *Biodegradation* 21:939-46.
- Fanin, N., Moorhead, D. y Bertrand, I. 2016. Eco-enzymatic stoichiometry and enzymatic vectors reveal differential C, N, P dynamics in decaying litter along a land-use gradient. *Biogeochemistry* 129:21–36.
- Fernandez, M., Rodriguez, R., Pico, Y. y Manes, J. 2001. Liquid chromatographic–mass spectrometric determination of post harvest fungicides in citrus fruits. *J. Chromatogr. A* 912:301–310.
- Fitz, W.J. y Wenzel, J.J. 2002. Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology* 99:259-278.
- Fleeker, J. y Lacy, H. 1997. Photolysis of methyl-2-benzimidazolecarbamate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 25:51-55.
- Fletcher, K., y Freedman, B. 1986. Effects of the herbicides glyphosate, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, and 2-4-dichlorophenoxyacetic acid on forest litter decomposition. *Can. J. For. Res.* 16: 6-9.
- Földényi, R., Czinkota, I. y Tolner, L. 2011. Pesticide-Soil interaction. En M. Stoytcheva (Ed.), *Pesticides in the modern world-Pesticides use and management* (pp. 439-462). Croacia: InTech.

- Forlani, G., Mangiacalli, A., Nielsen, E. y Suardi, C.M. 1999. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganism. *Soil Biol. Biochem.* 31(7): 991–997.
- Frampton, G.K., Jänsch, S., Scott-Fordsmand, J.J., Römbke, J. y Van Den Brink, P.J. 2006. Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: A review and analysis using species sensitivity distributions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25:2480-2489.
- Franz, J. E., Mao, M. K. y Sikorski, J. A. 1997. Glyphosate: a unique global herbicide. ACS Monograph 189. Washington, DC: American Chemical Society.
- Fukuto, T.R. 1990. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environmental Health Perspectives* 87:245-254.
- Gerrard, J. 2000. *Fundamentals of soils*. Nueva York: Routledge.
- Giesy, J.P., Dobson, S. y Solomon, K.R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev Environ Contam.* 167:35-120
- Gill, H.K. y Garg, H. 2014. Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. En M.L. Larramendy y S. Soloneski (Ed.), *Pesticides-toxic aspects* (pp. 187-230). Croacia: InTech.
- Giller K E, Witter E and McGrath S P 1998 Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1389–1414.
- Gimsing, A. L. y Borggaard, O. K. 2002. Effect of Phosphate on the Adsorption of Glyphosate on Soils, Clay Minerals and Oxides. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 82:545-552.
- Giovannetti, M. and Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection roots. *New Phytol.* 84:489-500.
- Girvan, M.S., Bullimore, J., Ball, A.S., Pretty, J.N. y Osborn, A.M. 2004. Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticides regimens. *Appl Environ Microbiol.* 70(5):2692–2701.
- Glass, R.L. 1987. Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals. *J.Agric. Food Chem.* 35:497–500.
- Gopal, M., Gupta, A., Arunachalam, V. and Magu, S.P. 2007. Impact of azadirachtin, an insecticidal allelochemical from neem on soil microflora, enzyme and respiratory activities. *Biores. Technol.* 98:3154-3158.
- Graham, J.H. 2000. Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis in agroecosystems. In: Podila GK, Douds DD, eds. *Current advances in mycorrhizae research*. St. Paul, MN, USA: APS Press, 127–140.
- Graham, J.H., Duncan, L.W. y Eissenstat, D.M. 1997. Carbohydrate allocation patterns in citrus genotypes as affected by phosphorus nutrition, mycorrhizal colonization and mycorrhizal dependency. *New Phytol* 135:335-343.
- Graham, J.H., Eissenstat, D.M. 1994. Host genotype and the formation of and function of VA mycorrhizae. *Plant and Soil* 159: 179–185.



- Graham, J.H. y Eissenstat, D.M. 1998. Field evidence for the carbon cost of citrus mycorrhizas. *New Phytologist* 140: 103–110
- Gupta, R. C. 1994. Carbofuran toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 43:383 - 418
- Hawes, M.C., Bengough, G., Cassab, G. y Ponce, G. 2003. Root caps and rhizosphere. *J Plant Growth Reg.* 21:352-367.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. y Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60:579-598.
- Hernández-Shek, M. A., Agudelo, A. C., Mendoza, C. y Torres Castañeda, H. 2012. Solar photo-Fenton optimisation in treating carbofuran-contaminated water. *Ingeniería e Investigación* 32(1):71-76.
- House, G.J., Worsham, A.D., Sheets, T.J. y Stinner, R.E. 1987. Herbicide effects on soil arthropod dynamics and wheat Straw decomposition in a North Carolina no-tillage agroecosystem. *Biol. Fert. Soils* 4:109-114.
- Huffman, E.W.D. 1977. Performance of a new carbon dioxide coulometer. *Microchem J* 22:567–573.
- Igbedioh, S.O. 1991. Effects of agricultural pesticides on humans, animals and higher plants in developing countries. *Arch Environ Health* 46:218-224.
- INEGI, 1979. Carta de edafología, Cuitzeo E14A13, scale 1:50 000; Carta de edafología, Morelia E14A23, scale 1:50 000.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). 2015. <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/carbofuran.pdf>. Consultado agosto de 2016.
- Jacobsen, C.S. and Hjelmsø, M.H. 2014. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* 27:15-20.
- Jaramillo, I. R. 2011. La micorriza arbuscular (MA) centro de la rizosfera: comunidad microbiológica dinámica del suelo. *ContactoS* 81:17–23.
- Jifon, J.L., Graham, J.H., Drouillard, D.L. and Syvertsen, J.P. 2002. Growth depression of mycorrhizal Citrus seedlings grown at high phosphorus supply is mitigated by elevated CO<sub>2</sub>. *New Phytol* 153:133-142.
- Johnsen, K., Jacobsen, C. S., Torsvik, V. y Sorensen, J. 2001. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils-a review. *Biol. Fertil. Soils* 33:443-453.
- Karam, M.A., Ramírez, G., Bustamante-Montes, L.P. y Galván, J.G. 2004. Plaguicidas y salud de la población. *Ciencia Ergo Sum* 11:246-254.
- Karczmar, A.G., Usdin, E. y Wills, J.H. 1970. *Anticholinesterase Agents*. Oxford: Pergamon Press.
- Khan, S.U. 1978. The interaction of organic matter with pesticides. *Developments in Soil Science* 8:137-171.

- Kiigemagi, U., Inman, R.D, Mellenthin, W.M. y Deinzer, M.L. 1991. Residues of benomyl (determined as carbendazim) and captan in postharvest-treated pears in cold storage. *J. Agric. Food Chem.* 39:40-403.
- Killham, K., 1985. A physiological determination of the impact of environmental stress on the activity of microbial biomass. *Environ. Pollut.* 38, 283–294.
- Kiss, A. y Virag, D. 2009. Photostability and photodegradation pathways of distinctive pesticides. *J Environ Qual.* 38:157–163.
- King, J.S., Albaugh, T.J., Allen, H.L., Buford, M., Strain, B.R. and Dougherty, P. 2002. Below-ground carbon input to soil is controlled by nutrient availability and fine root dynamics in loblolly pine. *New Phytol* 154:389-398.
- Kling, M. y Jakobsen, I. 1997. Direct application of carbendazim and propiconazole at field rates to the external mycelium of three arbuscular mycorrhizal fungi species: effect on <sup>32</sup>P transport and succinate dehydrogenase activity. *Mycorrhiza* 7:33–37.
- Lajtha, K. and Schlesinger, W.H. 1988. The Biogeochemistry of Phosphorus Cycling and Phosphorus Availability Along a Desert Soil Chronosequence. *Ecology* 69(1):24-39.
- Lancaster, S.H., Hollister, E.B., Senseman, S.A. y Gentry, T.J. 2010. Effects of repeated glyphosate applications on soil microbial community composition and the mineralization of glyphosate. *Pest Manage Sci* 66:59-64.
- Larsen, J., Thingstrup, I., Jakobsen, I. y Rosendahl, S. 1996. Benomyl inhibits phosphorus transport but not fungal alkaline phosphatase activity in a *Glomus* – cucumber symbiosis. *New Phytol.* 132:127–134.
- Lia, M. y Xie, X.M. 2007. Effect of heavy metals on substrate utilization pattern, biomass, and activity of microbial communities in a reclaimed mining wasteland of red soil area. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66 (2007) 217–223.
- Lin, X., Zhenan, H., Yanyan, F., Sifeng, Z. y Jun, Y. 2011. Isolation and Characteristics of Efficient Carbendazim Degradation Bacterium. *Advances in Biomedical Engineering* 1-2:384-388.
- Lo, C.C. 2010. Effect of pesticides on soil microbial community. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 45:348-359.
- McGuire, K.L., Bent, E., Borneman, J., Majumder, A., Allison, S.D. y Treseder, K.K. 2010. Functional diversity in resource use by fungi. *Ecology* 91:2324–2332.
- Mahalakshmi, M., Banumathai, A., Palanichamy, M. y Murungesan, V. 2007. Photocatalytic degradation of Carbofuran using semiconductor oxides., *Journal of Hazardous Materials* 143:240-245.
- Mahttiessen, P., Sheahan, D., Harrison, R., Kirby, M., Rycroft, R., Turnbull, A., Volkner, C. y William, R. 1995. Use of a *Gammarus pulex* bioassay to measure the effects of transient carbofuran runoff from farmland. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30:111-119.
- Mann, L., Tolbert, V. and Cushman, J. 2002. Potential environmental effects of corn (*Zea mays* L.) stover removal with emphasis on soil organic matter and erosion. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 89(3):149-166.

- Marschner, P., Crowley, D. y Yang, CH. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil* 261:199–208.
- Martensson, A.M. 1992. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing Rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. *Soil Biology and Biochemistry* 24:435–445.
- Martín, M., Martínez-Granero, F. y Rivilla, R. 2011. Colonización de la Rizosfera por Pseudomonas. En M. Megías, R. Rivilla, M.J. Soto, M. J. Delgado, E. González, P. F. Mateos, M. León, B. Rodelas y E. J. Bedmar (Ed.), *Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos* (pp333-344). España: Sociedad española de fijación de nitrógeno.
- Martínez-Valenzuela, C. y Gómez-Arroyo, S. 2007. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23:185-200.
- Martino, D. 1995. El Herbicida Glifosato: su manejo más allá de la dosis por hectarea. INIA La Estanzuela. Serie técnica No 61.
- Mazellier, P., Leroy, E. y Legube, B. 2002. Photochemical behavior of fungicide carbendazim in dilute aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 153:221-227.
- Menge, J.A., Steirle, D., Bagyaraj, D.J., Johnson, E.L.V., Leonard, R.T. 1978. Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytol* 80:575-578.
- Merrington, G., Rogers, S.L., Zwieten, L.V. 2002. The potential impact of long-term copper fungicide usage on soil microbial biomass and microbial activity in an avocado orchard. *Australian Journal of Soil Research* 40:749-759.
- Mogollón, J.P., Vera, M.C. y Martínez A. 2015. Efecto de los plaguicidas sobre la calidad química y biológica del suelo en sistemas de producción de hortalizas del semiárido venezolano. *Química viva* 1: 69-88.
- Mohanta, M.K., Saha, A. K., Zamman, M.T., Ekram, A.E., Khan, A.S., Mannan, S.B. and Fakruddin M. 2012. Isolation and characterization of carbofuran degrading bacteria from cultivated soil. *Biochem. Cell. Arch.* 12(2):313-320.
- Monroy, C.M., Cortés, A.C., Sicard, D.M. y Groot de Restrepo, H. 2005. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica* 25: 335-45.
- Moorhead, D. L. & Sinsabaugh, R. L. 2006. A theoretical model of litter decay and microbial interaction. *Ecol. Monogr.* 76:151–174.
- Moorman, T. B. 1989. A Review of Pesticide Effects on Microorganisms and Microbial Processes Related to Soil Fertility. *J. Prod. Agric.* 2:14-23.
- Mosse B, Phillips JM. 1971. The influence of phosphate and other nutrients on the development of vesicular-arbuscular mycorrhiza in culture. *Journal of General Microbiology* 1971: 157–166.
- Mosse B. 1973. Advances in the study of vesicular–arbuscular mycorrhizas. *Annual Review of Phytopathology* 11: 171–196.
- Murphy, J. and Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in

natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27:31-36.

- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G. y Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci.* 54:655-670.
- Ogram, A.V., Duan, Y.P., Trabue, S.L., Feng, X., Castro, H. and Ou, L.T. 2000. Carbofuran degradation mediated by three related plasmid systems. *FEMS Microbiology Ecology* 32(3):97-203.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2006. Roma: Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Recuperado el 23 de agosto de 2016, en <http://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf>.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2012. Noticias: El pacto mundial contra las plagas de las plantas conmemora sus 60 años de actividades. Recuperado el 29 de septiembre de 2016, en <http://www.fao.org/news/story/es/item/131978/icode/>.
- Ortíz, I., Ávila-Chávez, M.A. y Torres, L.G. 2013. Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* 4: 26-46.
- Ortíz-Hernández, M.L., Sánchez-Salinas, E., Dantán-González, E. y Castrejón-Godínez, M.L. 2013. Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process. En: R. Chamy y F. Rosenkranz (Ed.), *Biodegradation – Life os Science*. InTech. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/biodegradation-life-of-science/pesticide-biodegradation-mechanisms-genetics-and-strategies-to-enhance-the-process>.
- Otieno, P.O., Lalah, J.O., Virani, M., Jondiko, I.O., Schramm, K.W. 2010. Soil and water contamination with carbofuran residues in agricultural farmlands in Kenya following the application of the technical formulation Furadan. *J Environ Sci Health Part B* 45:137-144.
- Pandey, G., Dorrian, S.J., Rusell, R.J., Brearley, C., Kotsonis, S. y Oakeshott, J.G. 2010. Cloning and biochemical characterization of a novel carbendazim (methyl-1H-benzimidazol-2-ylcarbamate)-hydrolyzing esterase from the newly isolated *Nocardioides* sp. strain SG-4G and its potential for use in enzymatic bioremediation. *Appl Environ Microbiol.* 76:2940-2945.
- Pell, M., Stenberg B. and Torstensson, L. 1998. Potential Denitrification and Nitrification Tests for Evaluation of Pesticide Effects in Soil. *Ambio.* 27(1):24-28.
- Peng, S., Eissenstat, D.M., Craham, J.H., Williams, K. And Hodge, N.C. 1993. Growth Depression in mycorrhizal citrus at high phosphorus supply. *Plant Physiol.* 101:1063-1071.
- Petenello, M.C., Beltrán, C. y Feldman, S.R. Efecto del agregado de diésel-oil sobre algunos parámetros microbiológicos del suelo con y sin presencia de plantas. *Terra Latinoamericana* 32: 301-309.
- Pfeil, R. y Dellarco, V. 2005. Carbendazim (addendum). Ginebra, Suiza: Joint FAO/WHO Meetings on Pesticides Residues.
- Phillips, J. and Hayman, D. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society.* 55:157-160.

- Pimentel, D. y Levitan, L. 1986. Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. *BioScience* 36:86-91.
- Pimentel, D., Acquay, H., Biltonen, M., Rice, P., Silva, M., Nelson, J., Lipner, V., Giordano, S., Horowitz, A. y D'Amore, M. 1992. Assessment of Environmental and economic costs of pesticide use. En D. Pimentel y H. Lehman (Ed.), *The Pesticide Question: Environment, Economics and Ethics* (pp. 47-84). New York: Chapman and Hall.
- Pozo, C., Salmeron, Y., Rodelas, B., Martínez-Toledo, M.Y. y González-López, J. 1994. Effects of the herbicide alachlor on soil microbial activities. *Ecotoxicol.* 3: 4-10.
- Ratcliff, A.W., Busse, M.D. y Shestak, C.J. 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Appl Soil Ecol.* 34:114-124.
- Red de acción en plaguicidas y sus alternativas en América Latina (RAP-AL). 2008. Recuperado el 02 de agosto de 2016, en [http://www.rap-al.org/articulos\\_files/Carbofurano\\_Enlace\\_83.pdf](http://www.rap-al.org/articulos_files/Carbofurano_Enlace_83.pdf).
- Richards, R.P., Kramer, J.W., Baker, D. B. y Krieger, K.A. 1987. Pesticides in rainwater in the northeastern United States. *Nature* 327:129-131.
- Salunkhe, V.P., Sawant, I.S., Banerjee, K., Wadkar, P.N. y Sawant, S.D. 2014. Kinetics of degradation of carbendazim by *B. subtilis* strains: possibility of in situ detoxification. *Environmental monitoring and assessment* 186: 8599-8610.
- Sannino, F. y Gianfreda, L. 2001. Pesticide influence on soil enzymatic activities. *Chemosphere* 45:417-425.
- Santos, A. y Flores, M. 1995. Effects of glyphosate on nitrogen fixation of free-living heterotrophic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 20:349-352.
- Sarnaik, S.S., Kanekar, P.P., Raut, V.M., Taware, S.P., Chavan, K.S. y Bhadbhade, B.J. 2006. Effect of application of different pesticides to soybean on the soil microflora. *Journal of Environmental Biology* 27: 423-426.
- Sasser, M., 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Technical Note 101. Microbial ID, Inc., Newark, DE, USA.
- Schimel, J., Balsler, T.C., Wallenstein, M., 2007. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* 88:1386-1394.
- Schimel, J.P., Weintraub, M.N. 2003. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biology & Biochemistry* 35:549-563.
- Schipper, L.A. y Lee, W.G. 2004. Microbial biomass, respiration and diversity in ultramafic soils of West Dome, New Zealand. *Plant and Soil* 262: 151-158.
- Schippers, B., Bakker, A.W., Bakker, P.A.H.M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann Rev Phytopathol.* 25:339-358.
- Schweiger, P.F. y Jakobsen, I. 1998. Dose-response relationships between four pesticides and phosphorus uptake by hyphae of arbuscular mycorrhizas. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1415-1422.

- Schweiger, P.F., Spliid, N.H. y Jakobsen, I. 2001. Fungicide application and phosphorus uptake by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi into field-grown peas. *Soil Biology & Biochemistry* 33:1231-1237.
- Sinsabaugh, R.L., Hill, B.H. y Follstad Shah, J.J., 2009. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. *Nature* 462:795-798.
- Smith, E.A. y Oehme, F.W. 1992. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. *Vet Hum Toxicol.* 34:531-43.
- Smith, S.L., y Read, D. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. 2a ed. Gran Bretaña: Academic Press.
- SMN, CONAGUA, 2010. Normales climatológicas por estación. [http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=190&tmpl=component](http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=190&tmpl=component). Accessed August 16, 2015.
- Son, C.L. and Smith, S.E. 1988. Mycorrhizal growth responses: interactions between photon irradiance and phosphorus nutrition. *New Phytol* 108:305-314
- Souza, A.P., Ferreira, F.A., Silva, A.A., Cardoso, A.A. y Ruiz, H.A. 1999. Respiração microbiana do solo sob doses de glyphosate e de imazapyr. *Planta Daninha* 17(3):387-398.
- Spark, K.M. y Swift, R.S. 2002. Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. *The Science of the Total Environment* 298:147-161.
- Sposito, G. 2008. *The Chemistry of Soils*. 2a Ed. Nueva York: Oxford University Press.
- Sprankle, P., W. F. Meggitt, and D. Penner. 1975a. Rapid inactivation of glyphosate in the soil. *Weed Sci.* 23:224-228.
- Sprankle, P., W. F. Meggitt, and D. Penner. 1975b. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Sci.* 23:229-234.
- Sreenivasa, M.N. y Baguaraj, D.J. 1989. Use of pesticides for mass production of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum. *Plant and Soil* 119:127-132.
- Srinivasulu, M., Mohiddin, G.J., Subramanyam, K. and Rangaswamy V. 2012. Effect of insecticides alone and in combination with fungicides on nitrification and phosphatase activity in two groundnut (*Arachis hypogaea* L.) soils. *Environmental geochemistry and health* 34(3):365-374.
- Suresh, C.K. y Bagyaraj, D.J. 2002. Mycorrhiza-Microbe Interactions: Effect on rhizosphere. En A. K. Sharma y B. N. Johri (Ed.), *Arbuscular Mycorrhizae: Interactions in plants, rhizosphere and soils* (pp. 7-28.). USA, Plymouth, UK: Science Publishers, Inc. Enfield (NH).
- Suyamas, K. and Takagi, K. 1996. Interpretation of effect of some pesticide formulations on nitrification in paddy. *Soil pesticide Sci.* 3:329-332.
- Tabatabai, M.A. and Bremner, J.M. 1969. Use of p-Nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology & Biochemistry* 1:301-307.

- Tapia-Torres, Y., Elser, J.J., Souza, V. y García-Oliva, F. 2015. Ecoenzymatic stoichiometry at the extremes: How microbes cope in an ultra-oligotrophic desert soil. *Soil Biology & Biochemistry* 87:34-42
- Technicon. 1977. Technicon publication methods no. 329-74W/B. New York: Technicon.
- Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D' Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W. H., Simberloff, D. y Swackhamer, D. 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* 292:281-284.
- Tiyagi, S.A. Ajaz, M. y Azam, M.F. 2004. Effect of some pesticides on plant growth, root nodulation and chlorophyll content of chickpea. *Archives of Agronomy and Soil Science* 50: 529-533.
- Topp, E., Vallaey, T., y Soulas, G. 1997. Pesticides: microbial degradation and effects on microorganisms. En J.D. van Elsas, J.T. Trevors y E.M.H. Wellington (ed.), *Modern soil microbiology* (pp. 547-575). Nueva York: Dekker.
- Torstensson, L. 1985. Behaviour of glyphosate in soils and its degradation. In E. Grossbard, D. Atkinson (Eds.), *The Herbicide Glyphosate* (pp. 137-150). London: Butterworths.
- Tsui, M.T.K. y Chu, L.M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52:1189-1197.
- Tu, C.M. 1994. Effects of some insecticides on microbial activities in sandy soil. *J. Environ. Sci. Health, B*. 29(2):281-292.
- Univesidad de Minnesota. Biocatalysis/Biodegradation Database. Disponible en: [http://www.umbbd.ethz.ch/cbf/cbf\\_image\\_map1.html](http://www.umbbd.ethz.ch/cbf/cbf_image_map1.html).
- Uren, N.C. 2007. Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. En Pinton, R.Z., Varanini, P. y Nannipieri, P. (Ed.). *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil Plant Interface* (pp. 1-21). Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Uyanöz, R., Ümmühan, C. and Karaarslan, E. 2005. Effect of three fungicides on soil microbial activity and nitrogen dynamics. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 8(6):805-809.
- Valentine AJ, Osborne BA, Mitchell DT. 2001. Interactions between phosphorus supply and total nutrient availability on mycorrhizal colonization, growth and photosynthesis of cucumber. *Scientia Horticulturae* 88: 177-189.
- van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. y Van Straalen, N.M. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11:296-310.
- Veerawamy, J., Padmavathi, T. y Venkateswarlu, K. 1993. Effect of selected insecticides on plant growth and mycorrhizal development in sorghum. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 43:337-343.
- Venkateswarlu, K., Al-Garni, S.M. y Daft, M.J. 1994. The impact of carbofuran soil application on growth and mycorrhizal colonization by *Glomus clarum* of groundnut. *Mycorrhiza* 5:125-128.
- Verchot, L. and Borelli, T. 2005. Application of nitrophenol (NP) enzyme assays in degraded tropical soils. *Soil Biology & Biochemistry* 37:625-633.
- Vig, K., Singh, D.K., Agarwal, H.C., Dhawan, A.K. and Dureja, P. 1999. Effect of repeated

- pesticide application on soil properties in cotton fields. In Impact of long term pesticide usage on soil properties using radiotracer techniques (pp. 119-128). Austria: International Atomic energy agency.
- Vink, K. and Van Straalen, N.M. 1999. Effects of benomyl and diazinon on isopod-mediated leaf litter decomposition in microcosms. *Pedobiologia* 43(4): 345-359.
- Volke-Sepúlveda, T., Velasco-Trejo, J.A. y de la Rosa Pérez, D.A. 2005. Suelos Contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación,. México, D.F: Secretaría de Medio ambiente y Recursos Naturales-Instituto Nacional de Ecología.
- Von Ende, C.N. 1993. Repeated measures analysis: growth and other time- dependent measures. En Scheiner, S.M., Gurevitch, J. (eds.), *Design and Analysis of Ecological Experiments* (pp. 113-137). New York: Chapman and Hall.
- Waite, D.T., Grover, R., Wescott, N.D., Sommerstad, H. y Karr, L. 1992. Pesticides in ground water, surface water and spring runo! In a small Saskatchewan watershed. *Environ. Áoxicol. Chem.* 11:741-748.
- Walker, A. 2003. Adsorption and degradation from the laboratory to the real world. En pesticide in air, plant, soil and water system (pp.1-6). Piacenza, Italy: Proceedings of the X11 symposium pesticide chemistry.
- Wang, Y.S., Huang, W.C., Chen, W.C. and Yen, J.H. 2009b. Effect of carbendazim and pencycuron on soil bacterial community. *J. Hazard. Mater.* 172:84-91.
- Wang, X., Song, M., Gao, C., Dong, B., Zhang, Q., Fang, H. and Yu, Y. 2009a. Carbendazim induces a temporary change in soil bacterial community structure. *Journal of Environmental Sciences* 21:1679-1683.
- Wang, Y. y Jiang, Y. 2016. Chemotaxonomy of Actinobacteria. En D. Dhanasekaran y Y. Jiang (ed.), *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications* (cap. 5). In tech. Recuperado en: <http://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/chemotaxonomy-of-actinobacteria>
- Weed, S.B. y Weber, J.B. 1974. Pesticide-Organic Matter Interactions. En Guenzi, W.D., (Ed.), *Pesticides in soil and water* (pp.39-66). Madison WI: Soil Science Society of America.
- Wild, A. 1992. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Versión Española de P. Urbano Terrón y C. Rojo Fernández. Mundi-Prensa. Madrid. España.
- Wootton, M. A., Kremer, R.J. y Keast, A.J. 1993. Effects of Carbofuran and the Corn Rhizosphere on Growth of Soil Microorganisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50:49-56.
- World Health Organization (WHO). 1990. *Public Health Impacts of Pesticides Used in Agriculture*. Ginebra, Suiza: WHO in collaboration with the United Nations Environment Programme.
- Yan, H., Wang, D.D., Dong, B., Tang, F.F., Wang, B.C., Fang, H. y Yu, Y.L. 2011. Dissipation of carbendazim and chloramphenicol alone and in combination and their effects on soil fungal: bacterial ratios and soil enzyme activities. *Chemosphere* 84:634-641.
- Yarden, O., Salomon, R., Katan, J. y Aharonson, N. 1990. Involvement of fungi and bacteria in enhanced and nonenhanced biodegradation of carbendazim and other benzimidazole compounds in soil. *Can J*



Microbiol. 36:15–23.

- Yu, Y., Chu, X., Pang, G., Xiang, Y. y Fang, H. 2009. Effects of repeated applications of fungicide carbendazim on its persistence and microbial community in soil. *Journal of Environmental Sciences* 21:179-185.
- Zhang, X., Huang, Y., Harvey, P.R., Li, H., Ren, Y., Li, J., Wang, J. y Yang, H. 2013. Isolation and Characterization of Carbendazim-degrading *Rhodococcus erythropolis* djl-11. *PLoS One*. 8(10):e74810
- Zhao, H.P., Wu, Q.S., Wang, L., Zhao, X.T. y Gao, H.W. 2009. Degradation of phenanthrene by bacterial strain isolated from soil in oil refinery fields in Shanghai China. *J Hazard Mater* 164:863-869.
- Zobiolo, L.H.S., Kremer, R.J., Oliveira, R.S. y Constantin, J. 2011. Glyphosate affects micro-organisms in rhizospheres of glyphosate- resistant soybeans. *J Appl Microbiol*. 110:118-127.
- Zucconi, F., and M. De Bertoldi. 1987. Compost specifications for the production and characterization of compost from municipal solid waste. In De Bertoldi, M., M.P. Ferranti, P. L'Hermite, F. Zucconi (eds.), *Compost: Production, quality and use* (pp. 30-50). Essex, UK: Elsevier Applied Science.