



UNIVERSIDAD DEL MAR

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ATENUACIÓN DEL EFECTO NEGATIVO DEL GLIFOSATO APLICANDO
BIOSÓLIDO AL SUELO CONTAMINADO

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA

L.C.A. Natividad Tlacotempa Aviles

DIRECTOR

Dr. Eustacio Ramírez Fuentes

Puerto Ángel, Oaxaca, México

Agosto, 2020

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo no pudo llevarse a cabo sin el apoyo de varias personas a mí alrededor a quienes agradezco infinitamente el haberlo hecho; al Dr. Eustacio por su confianza al aceptarme en este trabajo, por su continua enseñanza y su apoyo total durante todo este tiempo; a la Dra. Nieves por siempre estar cuando tenía que resolver algunas dudas y su apoyo en el laboratorio al igual que su valiosa contribución al documento, al Dr. Edson por cada uno de sus consejos que me ayudaron a concluir esta meta y también por sus muy acertadas observaciones al trabajo escrito; a la Dra. Susana y al Dr. Estrada por sus comentarios que ayudaron a mejorar el contenido del trabajo, a todos ustedes gracias por reforzar en mí el amor y la pasión por la ciencia, de cada uno me llevo grandes enseñanzas.

A la Universidad del Mar, campus Puerto Ángel por ser mi hogar durante este tiempo y al programa Conacyt por la beca otorgada.

A mis compañeras de posgrado que también se han esforzado mucho durante este proceso y a quienes siempre les deseo mucho éxito.

A mi familia, que siempre ha estado conmigo, apoyándome incondicionalmente en todo momento, que a pesar de la distancia siempre me hacían sentir cerca de ellos. Mi madre, mi hermana, mis abuelitos, mis tíos, mis tías y mis primos, todos me han enseñado a ser fuerte, a dar lo mejor de mí, a tener convicciones y defenderlas con el corazón, a nunca olvidar de dónde vengo, que la humildad es un estilo de vida que debemos seguir, a siempre ayudar a quienes lo necesitan y lo más importante, a seguir a Dios y ayudar a otros a encontrarlo. Por ello, finalmente, le doy gracias a Dios, a quien le debo todo lo que soy y todo cuanto tengo.

Gracias a todos por formar parte de mi vida.

Naty

RESUMEN

El glifosato es el herbicida más utilizado a nivel mundial por su alta efectividad y bajo costo, actúa inhibiendo la síntesis de aminoácidos aromáticos en la vía del shikimato, presente en plantas y en microorganismos involucrados en procesos biogeoquímicos importantes, como el ciclo de carbono y nitrógeno; por lo cual, el uso desmedido del herbicida afecta la calidad del suelo y los cultivos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del glifosato sobre el índice de germinación en semillas de caoba y jamaica y el uso del biosólido como un atenuador del efecto negativo del glifosato en los microorganismos del suelo a nivel laboratorio (incubación aerobia) y en un cultivo de jamaica, las concentraciones de glifosato fueron de 1, 3 y 80 mg kg⁻¹ para las pruebas de germinación y la incubación y 1.9, 0.9 y 3.8 % de glifosato para el cultivo de jamaica. Se cuantificó en el suelo: la respiración microbiana, actividad enzimática (DAFt, deshidrogenasa, fosfatasa, β-glucosidasa), amonio, nitritos, nitratos y en la planta: la altura, clorofila (a, b y total) y antocianinas (cianidina y delfinidina) en hoja y cáliz. Los resultados mostraron que la presencia del glifosato causa una inhibición del índice de germinación en las semillas evaluadas, en la incubación estimula la respiración microbiana, actividad enzimática (DAFt), amonio y nitritos pero causa una disminución de nitratos en el suelo, en el cultivo de jamaica estimuló la producción de amonio y nitritos pero disminuyó la cantidad de antocianinas, clorofila b y actividades enzimáticas (deshidrogenasa, fosfatasa, β-glucosidasa), sin embargo este efecto fue minimizado al aplicar el biosólido, el cual aumentó 1.3 y 10.3 veces más la altura de la planta y la concentración de nitratos respectivamente. Como conclusión el glifosato a altas concentraciones (80 mg kg⁻¹) puede causar un efecto negativo sobre el proceso de nitrificación en el suelo, la aplicación del biosólido mejora las características del suelo y puede ser utilizado como fertilizante y atenuador de plaguicidas.

Palabras claves: Glifosato, actividad microbiana, biosólido, jamaica

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación de los herbicidas (FAO, 1996)	6
Figura 2: Fórmula estructural del glifosato	7
Figura 3: Rutas de degradación del glifosato.	10
Figura 4: Metodología general del proyecto de investigación	23
Figura 5: Esquema de la incubación del suelo.	26
Figura 6: Concentración promedio de los muestreos de dióxido de carbono en la incubación del suelo	33
Figura 7: Producción de CO ₂ acumulada durante la cinética de 42 días.....	33
Figura 8: Producción de CO ₂ acumulada durante la cinética de 42 días.....	34
Figura 9: Concentración promedio de los muestreos de amonio en la incubación del suelo	35
Figura 10: Concentración de amonio en tratamientos sin biosólido durante la cinética de 42 días	35
Figura 11: Concentración de amonio en tratamientos con biosólido durante la cinética de 42 días	36
Figura 12: Concentración promedio de los muestreos de amonio en el suelo en el ensayo en macetas	36
Figura 13: Concentración de nitritos en tratamientos sin biosólido durante la cinética de 42 días	38
Figura 14: Concentración de nitritos en tratamientos con biosólido durante la cinética de 42 días	38
Figura 15: Concentración promedio de los muestreos de nitritos en el suelo del ensayo en macetas.....	39
Figura 16: Concentración de nitratos en tratamientos sin biosólido en la cinética de 42 días.	41
Figura 17: Concentración de nitratos en tratamientos con biosólido en la cinética de 42 días.	41
Figura 18: Tasa neta de liberación de fluoresceína en tratamientos sin biosólido durante la cinética de 42 días.....	43

Figura 19: Tasa neta de liberación de fluoresceína en tratamientos con biosólido durante la cinética de 42 días.	43
Figura 20: Tasa neta promedio de liberación de fluoresceína durante la incubación del suelo.....	44
Figura 21: Tasa neta de liberación de fluoresceína en tratamientos sin biosólido en el ensayo en macetas.....	45
Figura 22: Tasa neta de liberación de fluoresceína en tratamientos con biosólido en el ensayo en macetas.....	45
Figura 23: Actividad deshidrogenasa en el suelo del ensayo en macetas....	46
Figura 24: Actividad enzimática β -glucosidasa en el suelo del ensayo en macetas.....	48
Figura 25: Actividad enzimática fosfatasa en el suelo del ensayo en macetas.....	49
Figura 26: Altura promedio de la planta de jamaica durante el experimento.....	50
Figura 27: Concentración de cianidina y delphinidina en los cálices de jamaica.....	55

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Propiedades fisicoquímicas del glifosato (Kidd, 1991).....	8
Cuadro 2: Límites máximos permisibles en México de metales pesados en biosólidos (NOM-004-SEMARNAT-2002).	17
Cuadro 3: Límites máximos permisibles en México de microorganismos patógenos y parásitos en biosólidos (NOM-004-SEMARNAT-2002).....	17
Cuadro 4: Aprovechamiento de biosólidos en México de acuerdo con su clasificación (NOM-004-SEMARNAT-2002).....	17
Cuadro 5: Longitud promedio de la raíz y del epicótilo en semillas de caoba y jamaica en 3 concentraciones de glifosato.....	31
Cuadro 6: Porcentaje del índice de germinación en semillas de jamaica y caoba con 3 concentraciones de glifosato.....	31
Cuadro 7: Concentración de clorofila “a”, “b” y total en hojas de jamaica.....	52
Cuadro 8: Concentración de cianidina en hojas de jamaica.....	53
Cuadro 9: Concentración de delfinidina en hojas de jamaica durante 105 días.....	54

ÍNDICE

RESUMEN.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE.....	viii
1 INTRODUCCIÓN.....	2
2 MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Importancia de los herbicidas en la agricultura.....	5
2.2 Herbicidas: Definición y Clasificación.....	5
2.2.1 Destino en el ambiente.....	6
2.2 Glifosato: Generalidades.....	7
2.2.1 Usos y modo de acción.....	9
2.2.2 Degradación del glifosato.....	9
2.2.3 Adsorción del glifosato en el suelo.....	10
2.2.4 Consecuencias ambientales.....	11
2.2.4.1 Efectos en las plantas.....	11
2.2.4.2 Efecto en animales y humanos.....	13
2.2.4.3 Efecto sobre los microorganismos.....	13
2.3 Lodo y Biosólido: Problemática y generación en México.....	15
2.3.1 Beneficio del uso del biosólido en el suelo.....	16
2.3.2 Normatividad.....	16
3 ANTECEDENTES.....	18
4 JUSTIFICACIÓN.....	21
5 HIPÓTESIS.....	22
6 OBJETIVOS.....	22
6.1 Objetivo general:.....	22
6.2 Objetivos Específicos:.....	22

7	METODOLOGÍA	23
7.1	Material utilizado.....	24
7.2	Pruebas de toxicidad en semillas.	24
7.3	Incubación del suelo.....	25
7.4	Ensayo en macetas.....	27
7.5	Análisis de datos.....	29
8	RESULTADOS	30
8.1	Toxicidad del glifosato en semillas de jamaica y caoba.....	30
8.2	Efecto en la actividad microbiana del suelo.....	32
8.2.1	Respiración microbiana.....	32
8.2.2	Amonio en el suelo.....	34
8.2.3	Nitritos en el suelo.....	37
8.2.4	Nitratos en el suelo.....	40
8.2.5	Actividad enzimática (DAFt).....	42
8.2.6	Actividad enzimática deshidrogenasa en el suelo.....	46
8.2.7	Actividad enzimática β -glucosidasa en el suelo.....	47
8.2.8	Actividad enzimática fosfatasa en el suelo.....	48
8.3	Efecto del glifosato sobre la planta de jamaica.....	50
8.3.1	Crecimiento de la planta.....	50
8.3.2	Clorofila "a", "b" y total.....	51
8.3.3	Antocianinas.....	52
9	DISCUSION	56
9.1	Toxicidad del glifosato en semillas de jamaica y caoba.....	56
9.2	Efecto en la actividad microbiana.....	57
9.2.1	Respiración microbiana.....	57
9.2.2	Amonio en el suelo.....	57
9.2.3	Nitritos en el suelo.....	58
9.2.4	Nitratos en el suelo.....	59
9.2.5	Actividad enzimática (DAFt).....	60
9.2.6	Actividad enzimática deshidrogenasa en el suelo.....	62
9.2.7	Actividad enzimática β -glucosidasa en el suelo.....	62

9.2.8	Actividad enzimática fosfatasa en el suelo.....	63
9.3	Efecto del glifosato sobre la planta de jamaica.....	64
9.3.1	Crecimiento de la planta.....	64
9.3.2	Clorofila “a”, “b” y total.....	65
9.3.3	Antocianinas.....	65
10	CONCLUSIONES.....	67
11	RECOMENDACIONES	68
12	BIBLIOGRAFÍA.....	69
13	ANEXOS.....	79
13.1	Anexo A: Características del biosólido y del suelo.....	79
13.2	Anexo B: Técnicas analíticas utilizadas	80

1 INTRODUCCIÓN

Los problemas ambientales se deben entre otras cosas al aumento de la población, lo que repercute en la intensificación de diversas actividades que dan bienestar al ser humano, una de ellas es el uso de plaguicidas para aumentar la productividad agrícola y satisfacer la demanda alimenticia de la población.

Los plaguicidas son sustancias o mezclas de sustancias que representan un riesgo para la salud humana y el ambiente debido a que pueden contaminar suelos, agua, sedimento y aire (Cheng, 1990), el consumo mundial en el 2006 fue de 95 025 toneladas (SENER 2007), estas sustancias se destinan a controlar plagas, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causan perjuicio o que interfieren con la producción agropecuaria y forestal (USEPA 2010).

Dentro de los plaguicidas, los herbicidas constituyen después de los insecticidas el segundo grupo mayormente producido y consumido por los agricultores, estos pueden alterar dependiendo de la dosis y el tipo de suelo los ecosistemas del suelo directa y/o indirectamente sobre los componentes de la microbiota del suelo, tales como patógenos de plantas, antagonistas, micorrizas o comunidades microbianas (Duncan y Paxton 1981., Wilcox 1996), estos efectos pueden repercutir en un incremento o una disminución de la incidencia de enfermedades en los cultivos a través de la promoción o supresión de las actividades de organismos patógenos (Lévesque y Rahe 1992)

En México la superficie agrícola varía entre 20 y 25 millones de hectáreas (CONAGUA 2008), en donde los insecticidas y herbicidas se usan en mayor porcentaje (44 %), siendo el glifosato uno de los herbicidas más consumidos (11%) y que de acuerdo con la secretaría de Economía tiene un costo aproximado de 100 pesos por litro (Salazar-López, 2011).

A nivel mundial, el glifosato ocupa el primer lugar de consumo y su demanda continúa creciendo por su alta efectividad y bajo costo, en los últimos 40 años se ha utilizado ampliamente bajo el supuesto que sus efectos secundarios son mínimos, sin embargo, actualmente ha surgido la preocupación sobre sus posibles efectos directos e indirectos del uso a gran escala de este herbicida para la calidad del suelo, del agua y la salud de las plantas, animales y humanos (Van Bruggen *et al.*, 2017).

Por lo tanto, resulta importante tener un manejo adecuado del glifosato y dar alternativas para mejorar los suelos donde se ha usado indiscriminadamente ocasionando problemas ambientales. El monitoreo de propiedades del suelo como la actividad microbiana, respiración, ciclo de nutrientes, actividades enzimáticas (Deshidrogenasas, fosfatasas, catalasas, esterasas, proteasas y β -glucosidasa) han sido estudiados como indicadores de cambios ambientales por su alta sensibilidad al efecto de los plaguicidas (Singh *et al.*, 2015).

Otro problema ambiental, es la generación de lodos residuales, subproducto del tratamiento de aguas residuales, en México aproximadamente se generan 640 000 toneladas de lodos residuales anuales de los cuales el 76% son depositados en tiraderos a cielo abierto, sin darles algún uso adicional (CONAGUA, 2011), sin embargo, la NOM-004-SEMARNAT-2002 indica que pueden ser aprovechados una vez que sus características físicas y químicas sean mejoradas mediante un proceso de estabilización y ahora es denominado biosólido.

La aplicación de biosólido mejora las propiedades del suelo, aumentando la actividad microbiana, materia orgánica y la capacidad de retención del agua, por lo cual puede ser utilizado como mejorador de suelo, fertilizante, biorremediador y atenuador de plaguicidas, por lo que puede ser utilizado para mitigar el efecto de los herbicidas sobre la actividad microbiana edáfica, sin embargo, no hay un antecedente del uso del biosólido como atenuador del efecto del glifosato en el suelo.

La implementación del uso de biosólido en el suelo reduciría las cantidades de lodo residual que deben ser depositados en tiraderos a cielo abierto y evitarían los focos de infección a enfermedades que estos resultan.

Por lo anterior en la presente investigación se evaluó el efecto del glifosato en los microorganismos del suelo en un ensayo en laboratorio y en macetas con la planta de jamaica aplicando biosólido, así como también se realizaron pruebas de toxicidad en semillas de *Hibiscus sabdariffa* (jamaica) y *Swietenia macrophylla* (caoba).

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Importancia de los herbicidas en la agricultura.

La agricultura es una de las actividades de producción humana que necesita de cantidades importantes de recursos naturales, tiempo y fuerza laboral para ofrecer un producto de calidad, por lo cual necesita apoyarse de distintas herramientas metodológicas.

El herbicida es una de las herramientas utilizadas por productores agrícolas durante el proceso de producción con el objetivo de controlar las malas hierbas y aumentar la productividad de los cultivos (González-Torralva *et al.*, 2010). El glifosato, es el herbicida más utilizado a nivel mundial, debe su popularidad a su uso como agente desecador en cultivos anuales, su bajo costo y a la aparición de cultivos genéticamente tolerantes a este herbicida (Bonny, 2016). Se estima que solo en el 2014 se aplicaron 747 millones de toneladas de glifosato en aproximadamente 1400 millones de hectáreas de terreno arable a nivel mundial (Benbrook, 2016).

México no es la excepción, en cuanto a la aplicación masiva de plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) indican que en México solo en el 2013 se aplicaron 31 195 toneladas de herbicidas y también se comercializan regionalmente herbicidas con glifosato como ingrediente activo, entre ellos: faena, Cacique 480, Nobel 62 %, Lafam, Eurosato y Agroma entre otros (Arellano-Aguilar y Randon von Osten, 2016).

2.2 Herbicidas: Definición y Clasificación.

Un herbicida es una sustancia o mezcla de sustancias utilizada para matar o inhibir el crecimiento de plantas indeseables (maleza) en terrenos que han sido o van a hacer cultivados, de acuerdo con la FAO (1996), los herbicidas se pueden clasificar en las siguientes categorías (Fig. 1).

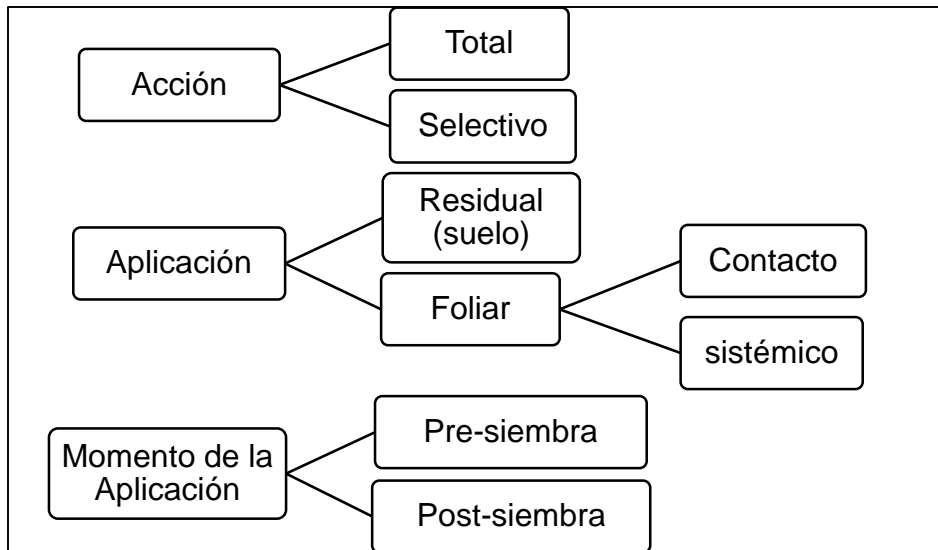


Figura 3: Clasificación de los herbicidas (FAO, 1996)

2.2.1 Destino en el ambiente

El destino de un plaguicida en el ambiente está gobernado por los procesos de retención, de transporte y de degradación en el suelo, así como por su interacción (Cheng, 1990). Estos procesos son los responsables de la degradación de la cantidad original aplicada de plaguicida, el que un proceso predomine sobre otro va a depender de las propiedades físico-químicas de los plaguicidas y de las características del suelo donde se ha aplicado.

Una vez que ingresa al suelo, el plaguicida se reparte en las fases sólida, líquida y gaseosa:

- En la fase líquida está disponible para ser transformado o degradado química, física o microbiológicamente a otros compuestos; o ser lixiviado hacia horizontes más profundos y finalmente llegar al agua subterránea.
- En la fase sólida es retenido con diferente fuerza en lugares de enlace de los coloides orgánicos (materia orgánica) e inorgánicos (arcillas) del suelo. En esta situación, los plaguicidas pueden migrar transportados por el agua, en un proceso conocido como erosión hídrica, o transportados por el aire, proceso conocido como erosión eólica.

- En la fase gaseosa se incorpora a la atmósfera cuando se volatiliza desde el suelo o desde el agua que se encuentra en el suelo.

2.2 Glifosato: Generalidades

El glifosato es un herbicida organofosforado, sistémico, de acción foliar, se mueve en el floema hacia los puntos meristemáticos; es de amplio espectro, aplicación post-emergencia, color ambarino claro con olor tenue a amina. Sus propiedades físico-químicas se presentan en el cuadro 1.

El glifosato es una sal isopropilamina de N-(fosfometil) glicina, con un peso molecular de 228.18 g/mol. Está formada por una fracción de glicina y un radical aminofosfato unido como sustituyente de uno de los hidrógenos del grupo α -amino (Fig. 2).

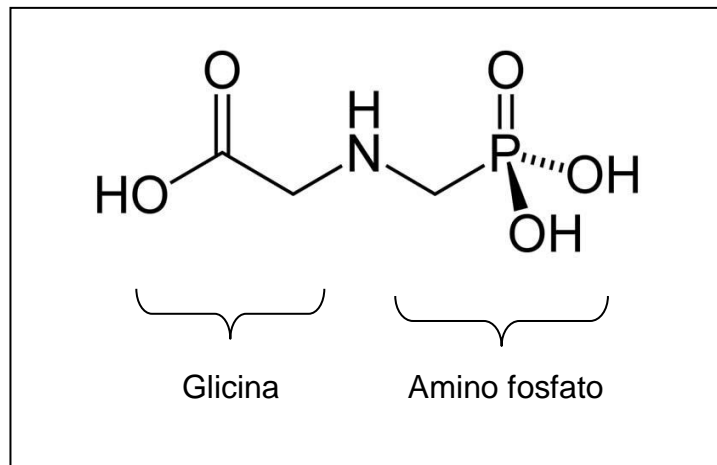


Figura 4: Fórmula estructural del glifosato

En distintos países es comercializado bajo los nombres de Aquamaster, Faena, Mamba, Sankill, Glyfos, Roundup y Ramrod en presentaciones de concentrado soluble, gránulo soluble, líquido, polvo soluble, solución concentrada y solución acuosa, en concentraciones de 350 a 720 gramos de ingrediente activo por litro o por kilogramo (COFEPRIS, 2009).

Cuadro 1: Propiedades fisicoquímicas del glifosato (Kidd, 1991).

Propiedad	Compuesto Puro (Ingrediente activo)	Sal de glifosato-Isopropilamonio
Fórmula molecular	C ₃ H ₈ NO ₅ P	C ₆ H ₁₇ N ₂ O ₅ P
Peso molecular	169.1 g/mol	228.2 g/mol
Estado físico	Sólido blanco	Líquido viscoso de color ámbar a amarillo
Olor	Inodoro	Prácticamente inodoro, ligero olor a amina
Densidad	0.5 g/MI	1,160 - 1,180 g/mL
Punto de fusión	184,5°C	No aplicable
Presión de vapor	1,84x10 ⁻⁷ mm de Hg a 45°C	3x10 ⁻⁷ mm Hg a 25°C
Punto de ebullición	Se descompone	Se descompone
pH en solución al 1%	2.5	4.7
Solubilidad en agua	12.000 ppm a 25°C	900.000 ppm a 25°C
Otros solventes	Ninguno	Solo soluble en agua
Estabilidad	32 días a 25°C y pH=5.7 ó 9	32 días a 25°C y pH=7 ó 9
Coefficiente de partición octanol/agua	P _{ow} = -2.8	
Constante de la Ley de Henry	< 7x10 ⁻¹¹	
Corrosividad	No corrosivo	No corrosivo

2.2.1 Usos y modo de acción

El herbicida glifosato se usa en la mayoría de los cultivos incluidos los forestales y los cultivos perennes leñosos (Busse *et al.*, 2001). De acuerdo con las cifras registradas en la base de datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, en su división de estadística (FAOSTAT), en el período comprendido del año 2004 al 2009, a nivel mundial se consumieron un promedio de 763 913.93 toneladas de plaguicidas, de los cuales un promedio del 16.1 % (122 990 toneladas) fueron consumidos en México, llegando a tener un máximo de utilización en el 2009 con 21.6% del total del consumo mundial. En México los insecticidas y los herbicidas se emplean en mayor porcentaje (44%).

El mecanismo de acción del glifosato es por medio de la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina) mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato-sintasa (EPSPS) que está integrada en la ruta del ácido shiquímico en plantas, hongos y bacterias. Esta enzima cataliza la reacción entre shiquimato 3 fosfato (S3P) y fosfoenolpiruvato (PEP) para formar 5-enolpiruvil shiquimato 3-fosfato y fósforo inorgánico (Pi). El descontrol en la catálisis por la enzima EPSPS en el penúltimo paso en la vía del shiquimato, reduce la producción de proteínas y también la biosíntesis de otros compuestos tales como lignina, alcaloides, ácidos benzoicos, isoflavonas (fitohormonas) tetrahidrofolato, ubiquinona y vitamina K (Eslava *et al.*, 2007; COFEPRIS, 2009).

2.2.2 Degradación del glifosato

La principal vía de degradación del glifosato en el suelo es mediante los microorganismos presentes en él, en la literatura se describen dos rutas de degradación (Fig. 3), la principal es debido a la acción de la enzima glifosato oxidoreductasa en el enlace C-N del herbicida que da origen a su principal metabolito, el ácido animo metil fosfónico (AMPA) y glioxilato, finalmente el amonio y CO² son los productos finales de esta ruta (Duke, 2011).

La segunda ruta es mediante la actividad de carbono-fósforo liasa dando como producto de reacción sarcosina y fosfato inorgánico, la sarcosina a su vez se degrada en formaldehído, glicina y CO₂ reacción catalizada por una sarcosina oxidasa (Liu *et al.*, 1991).

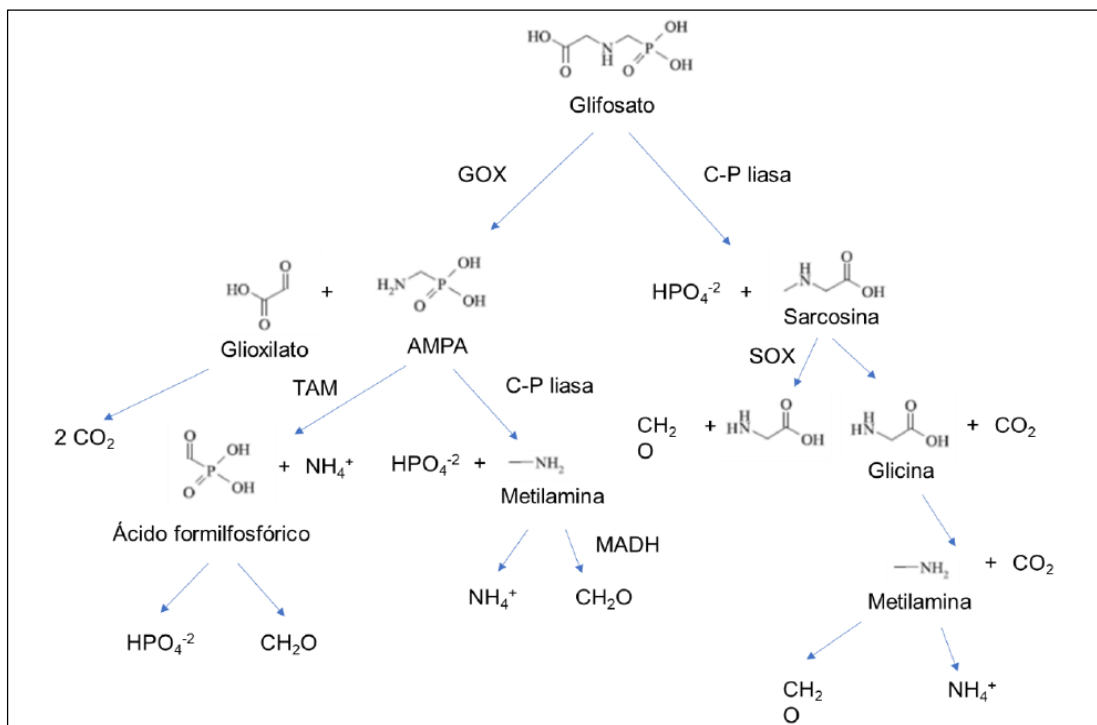


Figura. 3: Rutas de degradación del glifosato.

2.2.3 Adsorción del glifosato en el suelo

El glifosato tiene una alta afinidad a la adsorción en el suelo, debido a que su molécula es fácilmente ionizable a través de distintos mecanismos. Dado que es un compuesto orgánico dipolar tiene una rápida y fuerte adsorción con óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio y las arcillas (Cuervo y Fuentes., 2014).

Al tener en su estructura un grupo amino y dos grupos ácidos (un carboxílico y otro fosfónico) la molécula posee características anfotéricas por lo que tiene una fuerte actividad quelante de cationes divalentes (Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺) formando complejos estables con estos elementos (Schütte, *et al.*, 2017).

El pH y la materia orgánica también ejercen un efecto en la adsorción del glifosato. Dependiendo del pH el glifosato puede tener cuatro constantes de ionización ($pK_a = 2, 2.6, 5.8$ y 10.8), un rango de pH entre 4 y 8 el glifosato se mantiene en su forma iónica produciendo una gran afinidad por los cationes trivalentes Al^{3+} y Fe^{3+} (Okada *et al.*, 2016).

2.2.4 Consecuencias ambientales

Las consecuencias del glifosato sobre el medio ambiente tienen que ver con su destino en el ambiente y su permanencia en él. En el suelo, dado el uso generalizado del glifosato y su continua demanda, éste ha podido contaminar los suelos dentro y fuera de las áreas tratadas ya que llega acumularse por su adsorción a la arcilla y materia orgánica del suelo, haciendo lenta su degradación (Cassigneul *et al.*, 2016), por lo que el glifosato y su producto de degradación (AMPA) pueden persistir durante más de un año en suelos con alto contenido de arcilla pero pueden lixiviarse rápidamente en suelos arenosos (Bergström *et al.*, 2011; Okada *et al.*, 2016; Sidoli *et al.*, 2016) y terminar en aguas subterráneas después de fuertes lluvias (Maqueda *et al.*, 2017; Rendón-von Osten y Dzúl-Caamal, 2017).

Además de la lluvia, la erosión también puede transportar partículas de suelo con glifosato y AMPA a cuerpos de agua superficial donde puede permanecer en fase particulada en el sedimento o disolverse en el agua (Yang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Maqueda *et al.*, 2017).

2.2.4.1 Efectos en las plantas.

El glifosato llega a las plantas no objetivo como resultado del contacto directo, del lavado desde las hojas y de la exudación de las raíces de las malezas tratadas. El glifosato es tóxico tanto para las plantas monocotiledóneas (gramíneas) como dicotiledóneas (la mayoría de las plantas de hoja ancha).

La absorción y translocación de glifosato en las plantas se ve reforzada por los agentes tensoactivos en el producto formulado cuya finalidad es facilitar el ingreso del herbicida a los tejidos de la planta. La translocación se realiza hacia arriba y hacia abajo en toda la planta de modo que el glifosato se acumula en las raíces, frutos y semillas (Li *et al.*, 2005; Walker y Oliver, 2008).

El glifosato y su principal metabolito AMPA, inhiben la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, peroxidasa, ascorbato peroxidasa) induciendo la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que promueven el daño celular, también disminuyen la fotosíntesis por el daño directo del herbicida al cloroplasto (Reddy *et al.*, 2004), el daño ocasionado dependerá de la cantidad del herbicida aplicado, teniendo como resultado el amarillamiento y necrosis del follaje (Gomes *et al.*, 2016).

Las plantas tratadas con glifosato no producen compuestos aromáticos secundarios, incluidas las fitoalexinas antimicrobianas que defienden las plantas contra los patógenos. En consecuencia, estas plantas mueren por infección por patógenos de la raíz que están universalmente presentes en el suelo, especialmente hongos (Babiker *et al.*, 2011).

Otro problema, que ha surgido en respuesta al uso intensivo de glifosato es la aparición generalizada de especies de malezas resistentes al glifosato (Shaner *et al.*, 2012., Schafer *et al.*, 2014). La resistencia al glifosato en las plantas puede ser conferida por varios mecanismos tales como cambios en la translocación como resultado de genes transportadores modificados, mutaciones puntuales del sitio objetivo que lo hacen insensible o desintoxicación del herbicida (Chekan *et al.*, 2016). Recientemente, se encontraron genes alternativos de resistencia al glifosato que podrían incorporarse en cultivos genéticamente modificados en el futuro cercano (Tian *et al.*, 2015).

2.2.4.2 Efecto en animales y humanos.

El ingreso de glifosato en los seres humanos y animales es mediante la ingesta de alimentos contaminados o su exposición directa con el herbicida. Se han encontrado correlaciones entre el aumento del uso de glifosato y una amplia variedad de enfermedades humanas, incluyendo diversas formas de cáncer, daño renal y trastornos mentales como, autismo, Alzheimer y Parkinson (Fluegge y Fluegge, 2016; Fortes *et al.*, 2016), además de abortos espontáneos, enfermedades dermatológicas y respiratorias (Otaño *et al.*, 2010; Camacho y Mejía, 2017).

El glifosato y los surfactantes también tienen un impacto negativo en la salud de una variedad de animales en la red alimentaria acuática, incluidos protozoos, mejillones, crustáceos, ranas y peces, similares a los efectos sobre los animales terrestres. Sin embargo, la experimentación sobre los efectos tóxicos de los adyuvantes en la salud de organismos acuáticos ha sido bastante limitada debido a la naturaleza patentada de estos químicos (Durkin, 2011).

2.2.4.3 Efecto sobre los microorganismos

La vía del shikimato está presente no solo en las plantas, sino también en los hongos y bacterias, lo que hace que muchos taxones de microorganismos sean sensibles al glifosato. Sin embargo, no todos los organismos con la vía del shikimato son sensibles al glifosato, dependiendo de la clase de EPSPS que producen: clase I EPSPS es sensible al glifosato y clase II EPSPS es tolerante al glifosato (Priestman *et al.* 2005., Funke *et al.*, 2007). Por lo tanto, la aplicación del glifosato afecta la diversidad microbiana y la actividad enzimática en la rizosfera y el suelo circundante, (Arango *et al.*, 2014).

Algunos microorganismos sensibles al glifosato promueven el crecimiento de las plantas, tales como: *Burkholderia* spp., *Pseudomonas* spp., hongos micorrízicos arbusculares y *Rhizobium* spp que fija el nitrógeno (Zobiolo *et al.*, 2011), dando como resultado una reducción del crecimiento de la planta y/o cambios en la cubierta y composición de la vegetación del pastizal (Arango *et al.*, 2014).

Respecto a los microorganismos en el medio acuático se han demostrado los efectos negativos del glifosato y del surfactante para varias especies de microalgas, bacterias acuáticas y protozoos (Rodríguez-Gil *et al.*, 2017). Los modos de acción en los microorganismos acuáticos son similares a los de las plantas y microorganismos terrestres: el glifosato afecta la síntesis de aminoácidos aromáticos, la producción de clorofila, la fotosíntesis y la respiración (Mensink y Janssen, 1994).

2.3 Lodo y Biosólido: Problemática y generación en México.

El tratamiento de las aguas residuales, tanto municipales como industriales, tiene como objetivo remover los contaminantes presentes para hacerlas aptas para otros usos o bien para evitar daños al ambiente por los posibles contaminantes que pudieran tener al ser descargados. Sin embargo, el tratamiento aerobio del agua residual trae como consecuencia la formación de lodos residuales, sub-productos indeseables difíciles de tratar que implican un costo extra en su manejo y disposición (García, 2006).

Los lodos residuales producidos durante las etapas del tratamiento primario y secundario del agua residual, es necesario estabilizarlos para poder disponerlos en su destino final reduciendo la atracción de vectores (insectos, ratas, carroñeros, etc.) y su volumen (Limón, 2013), además de analizarlos para determinar sus características de corrosividad, reactividad, explosividad, toxicidad y biológico-infecciosas (análisis CRETIB), (NOM-052-ECOL-1993) (Oleszczuk y Hollert, 2011) y con base a esto, definir las alternativas para su manejo y disposición.

En muchos casos en el mundo gran parte de los lodos generados en una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) son incinerados (Morgano *et al*, 2018) o descargados en sistemas de alcantarillado, en cuerpos de agua o dispuestos en tiraderos a cielo abierto sin ningún tratamiento previo que permita tomar las medidas de protección adecuadas para evitar la contaminación del suelo, agua subterránea o la atracción de vectores, generando problemas de contaminación de los mantos freáticos y de salud pública (Kończak y Oleszczuk, 2018).

En México aproximadamente se generan 640 000 toneladas de lodos residuales anuales de los cuales el 76% se depositan en rellenos, es decir no se les da ningún uso adicional (CONAGUA, 2011).

Según la NOM-004-SEMARNAT-2002 los lodos pueden ser susceptibles de aprovechamiento transformándolos a biosólido mediante un proceso de estabilización que mejore su contenido de materia orgánica, nutrientes y elimine la mayoría de los microorganismos patógenos y metales pesados.

2.3.1 Beneficio del uso del biosólido en el suelo.

El biosólido es una buena fuente de materia orgánica y nutriente, por ello se ha convertido en un suplemento prometedor para la actividad agrícola y la restauración de suelos. El uso del biosólido, es un ejemplo de cómo aprovechar la generación de lodos residuales, de reducir el uso de fertilizantes químicos y mitigar el impacto de los agroquímicos en el suelo (Dad *et al.*, 2019)

La aplicación de biosólido al suelo mejora las propiedades físico-químicas del suelo como densidad aparente, porosidad, capacidad de retención del agua, capacidad de intercambio catiónico, incrementa la actividad enzimática y biomasa microbiana, además de aportar micro (Fe, S, Mo, Al, Ca, Mg y Zn) y macronutrientes (N, P y K) para el crecimiento de cultivos (Sharma *et al.*, 2017).

2.3.2 Normatividad

En México, el uso de lodos y biosólidos está regulado bajo la NOM-004-SEMARNAT-2002, además, deberán contar con la “Constancia de no peligrosidad de los mismos”, de acuerdo al trámite SEMARNAT 07-007.

La NOM-004-SEMARNAT-2002 indica los límites máximos permisibles de contaminantes que pueden contener los lodos y biosólidos para su aprovechamiento y recomienda algunos procesos para controlar la atracción de vectores de parte de los biosólidos. Esta norma clasifica a los biosólidos de acuerdo con el contenido de metales pesados (cuadro 2) o de microorganismos patógenos y parásitos (cuadro 3) para establecer el aprovechamiento que se les podrá dar a los biosólidos (cuadro 4).

Cuadro 2: Límites máximos permisibles en México de metales pesados en biosólidos (NOM-004-SEMARNAT-2002).

Contaminante	Excelentes mg kg⁻¹ base seca	Buenos mg kg⁻¹ base seca
Arsénico	41	75
Cadmio	39	85
Cromo	1200	3000
Cobre	1500	4300
Plomo	300	840
Mercurio	17	57
Níquel	420	420
Zinc	2800	7500

Cuadro 3: Límites máximos permisibles en México de microorganismos patógenos y parásitos en biosólidos (NOM-004-SEMARNAT-2002).

	Bacterias	Patógenos	Parásitos
Clase	Coliformes fecales NMP/g en base seca	<i>Salmonella spp.</i> NMP/g en base seca	huevos de helmintos/g en base seca
A	Menor de 1000	Menor de 3	Menor de 1
B	Menor de 1000	Menor de 3	Menor de 10
C	Menor de 2 000 000	Menor de 300	Menor de 35

Cuadro 4: Aprovechamiento de biosólidos en México de acuerdo con su clasificación (NOM-004-SEMARNAT-2002).

Tipo	Clase	Aprovechamiento
Excelente	A	Usos urbanos con contacto público directo durante su aplicación. Los establecidos para la clase B y C
Excelente o bueno	B	Usos urbanos sin contacto público directo durante su aplicación. Los establecidos para la clase C
Excelente o bueno	C	Usos forestales, mejoramiento de suelos y usos agrícolas

3 ANTECEDENTES

Actualmente se han reportado los efectos negativos del glifosato sobre los microorganismos del suelo, específicamente sobre las bacterias oxidadoras de amonio, Allegrini *et al.*, (2017) estudiaron la exposición repetida de glifosato sobre la comunidad microbiana del suelo y sobre las bacterias oxidadoras de amonio utilizando PCR cuantitativa en tiempo real, los resultados no mostraron diferencias significativas respecto a la abundancia de los microorganismos pero si mostraron un cambio en la estructura de las bacterias oxidadoras de amonio, concluyendo que las aplicaciones continuas de glifosato tienen un impacto negativo en grupos bacterianos involucrados en procesos clave para el ciclo del C y N en el suelo.

Otra de las razones por el cual el glifosato es estudiado es por los efectos que pudiera tener en plantas no objetivo, Sikorski *et al.*, (2019) en un estudio donde evaluaron el efecto del glifosato mediante pruebas biológicas y enzimáticas sobre *Lemna minor* (lenteja de agua común) que es utilizada ampliamente como organismo indicador en evaluaciones de riesgos ambientales, los resultados mostraron que la acumulación de glifosato en tejidos vegetales provoca una disminución de su crecimiento y del rendimiento, además de inhibir la síntesis de clorofila (a y b) y carotenoides, también disminuye la actividad fotoquímica del fotosistema II (PSII), causa un aumento en la actividad peroxidasa y catalasa, este estudio concluyó que el glifosato provoca cambios morfológicos y bioquímicos en plantas no objetivo y ejerce efectos tóxicos en ecosistemas acuáticos, incluso en exposiciones a corto plazo.

Los efectos negativos del glifosato no solo se han visto en el crecimiento de plantas, sino también desde la germinación, Lallana *et al.*, (2013) determinaron la concentración efectiva media (CE50) que el glifosato reduce el crecimiento radicular mediante bioensayos de germinación con semillas de lechuga y trigo, se probaron 9 dosis decrecientes entre 1.2 y 0.01 g ha⁻¹ y 5 dosis entre 12.15 y 1.2 g ha⁻¹ para lechuga y trigo respectivamente, midieron

la longitud radicular, determinaron el porcentaje de germinación y calcularon el índice de germinación, como resultados tuvieron que las CE50 que reducen el crecimiento radicular son 6.6 y 9.4 g ha⁻¹ para lechuga y trigo respectivamente y que el porcentaje de germinación no es afectada por la presencia del herbicida.

Respecto a los biosólidos, estos son generados a partir de distintos procesos de estabilización de los lodos residuales con la finalidad de reducir su volumen y que pierdan sus propiedades contaminantes (Marguí, *et al.*, 2016), esto con la finalidad de ser aprovechados en diferentes propósitos: composta, fertilizantes, mejorador de suelos, reutilización en procesos industriales y producción de energía eléctrica (NOM-004-SEMARNAT-2002).

Ya se han realizado estudios utilizando biosólidos para diversos fines. Potisek-Talavera *et al.*, (2010), evaluaron el contenido de materia orgánica, micro y macronutrientes en el suelo después de la aplicación del biosólido, así como su distribución en el perfil del suelo, este estudio se llevó a cabo en columnas de PVC con suelo de textura franco-arcillo-limosa, los tratamientos fueron dosis de biosólido (100 y 200 mg/ha, 100 kg N/ha como sulfato de amonio y un testigo sin fertilizar, teniendo como resultado que la aplicación del biosólido incrementa la materia orgánica, la concentración de nitrato, fósforo aprovechable y micronutrientes en todo el perfil del suelo, concluyendo que el uso de biosólido en suelos agrícolas, forestales y pastizales puede ser una alternativa de disposición final, lo que permite aportar nutrientes a los cultivos y reducir los costos de producción.

En el 2016 Acosta y Hernández utilizaron el biosólido como mejorador de suelo, ellos evaluaron el proceso de biorremediación del toxafeno en un suelo agrícola aplicando el biosólido como fuente de nutrientes esenciales para los microorganismos edáficos, utilizaron dos tratamientos con una relación suelo-biosólido de 71:21 y 77:23 (p:p) respectivamente y un control, los resultados muestran que los tratamientos con biosólido presentan un mayor porcentaje de remoción de 84% y 69% respectivamente mientras que en el control fue de 25.1% concluyendo que el biosólido puede ser utilizado como fuente de nutrientes para la estimulación metabólica de microorganismos autóctonos en el proceso de remediación de suelos contaminados con toxafeno.

No hay literatura que reporte el uso de biosólido y glifosato, pero se ha demostrado que el uso de composta tiene influencia sobre el destino del glifosato en el suelo. Erban, *et al.*, (2018), estudiaron el comportamiento de glifosato y del ácido aminometilfosfónico (AMPA) en un suelo modificado con composta, evaluando el efecto de la dosis empleada, profundidad de muestreo, humedad y conductividad eléctrica del suelo, los resultados mostraron que la concentración de ambos compuestos disminuye gradualmente con la aplicación de composta y concluyeron que los factores físicos como la humedad y la conductividad eléctrica son muy importantes para comprender el comportamiento del glifosato y AMPA en el suelo.

4 JUSTIFICACIÓN

Las grandes cantidades de lodos residuales que se producen en las distintas plantas de tratamiento de agua se han convertido en un problema ambiental y de salud, a pesar que sus características físico-químicas y microbiológicas los hace aptos para ser utilizados como fertilizantes en la agricultura y jardinería, en la restauración de suelos y actualmente se ha estudiado su aplicación para mitigar el efecto negativo de los plaguicidas en el suelo, su uso aun no es muy común.

Por lo anterior, la finalidad de este trabajo es dar una alternativa de aprovechamiento de los biosólidos, generados a partir de lodos residuales ante otra problemática ambiental, que es, la contaminación del suelo por el herbicida glifosato que es ampliamente utilizado en la agricultura.

Aunque la literatura señale los efectos nocivos del glifosato en la matriz del suelo, su estudio ha tomado relevancia por las consecuencias que tiene en los microorganismos que intervienen en el ciclo de nutrientes, sin embargo, no hay un antecedente del uso del biosólido y como este pudiera ayudar a mitigar el efecto negativo del glifosato sobre los microorganismos edáficos, por lo que la realización de este proyecto contribuirá a la obtención de datos respecto a este tema, específicamente sobre los microorganismos nitrificantes.

5 HIPÓTESIS

Las características fisicoquímicas y microbiológicas del biosólido como la materia orgánica, ayudaran a mitigar el efecto tóxico del glifosato en suelos contaminados, estimulando la actividad microbiana edáfica y favoreciendo el crecimiento de la planta de jamaica.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general:

Evaluar la efectividad del biosólido en el suelo para disminuir el efecto tóxico del glifosato en el crecimiento de la planta de jamaica y en la actividad microbiana edáfica.

6.2 Objetivos Específicos:

- 1.- Evaluar el efecto tóxico del glifosato en semillas de *Hibiscus sabdariffa* (jamaica) y *Swietenia macrophylla* (caoba).
- 2.- Analizar el efecto del glifosato en la actividad microbiana del suelo en un experimento en condiciones de laboratorio.
- 3.- Evaluar la aplicación del biosólido para mitigar el efecto tóxico del glifosato en cultivo de jamaica en macetas.

7 METODOLOGÍA

Para cumplir con los objetivos planteados se llevaron a cabo 3 experimentos, que se describen de manera general en la Fig. 4.

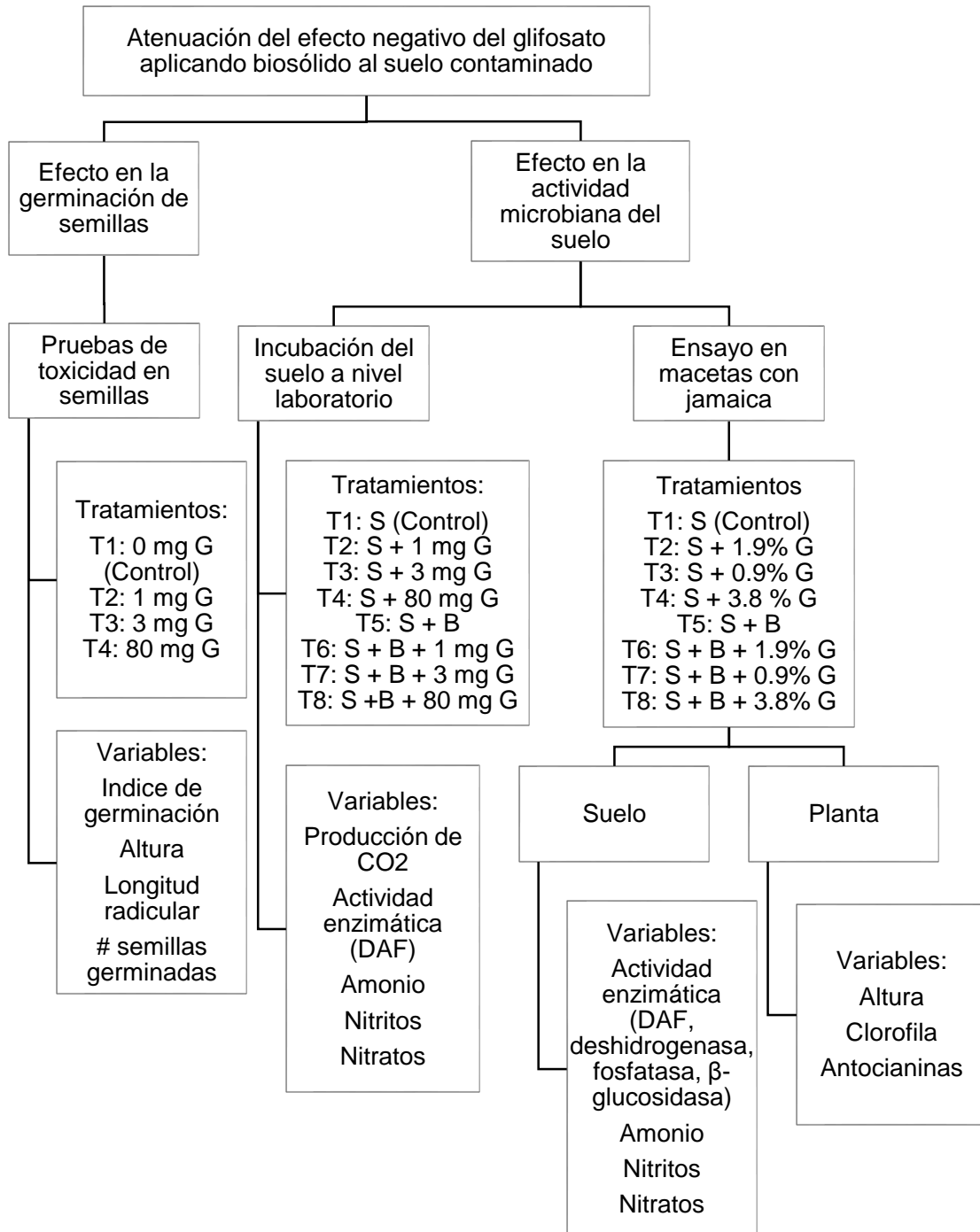


Figura 4: Metodología general del proyecto de investigación. S (suelo), B (biosólido).

7.1 Material utilizado

El suelo utilizado fue de la comunidad de Santo Domingo de Morelos, Oaxaca. México, el cual tiene historial agrícola con la siembra de cultivos entre ellos la jamaica, y el biosólido lo proporcionó el laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Mar, campus Puerto Ángel, ambos fueron previamente caracterizados por Jimarez-Ortiz *et al.*, (2018) sus características se presentan en el anexo A, el biosólido está clasificado según la NOM-004-SEMARNAT-2002 como tipo A y de clase Excelente, de acuerdo a la clasificación de Oviedo-Ocaña *et al.*, (2015) es muy estable. El biosólido fue elaborado a partir de un proceso de compostaje de lodos residuales provenientes de la planta de tratamiento de agua residual en Bahías de Huatulco, Oaxaca.

Se utilizó el herbicida glifosato en fórmula comercial (SECAMEX) con 432.8 g L⁻¹ del ingrediente activo.

7.2 Pruebas de toxicidad en semillas.

Previo a las pruebas de toxicidad, se realizó una prueba de viabilidad de germinación con la exposición a cloruro de trifeniltetrazolio (Moore, 1985) y posteriormente se midió su índice de germinación. Se utilizaron 120 semillas de *Swietenia macrophylla* (caoba) y 360 de *Hibiscus sabdariffa* (jamaica) y se evaluaron 3 concentraciones de glifosato (SECAMAX) 1, 3 y 80 mg kg⁻¹.

Para la realización de la prueba de toxicidad se colocaron 30 semillas de jamaica y 10 semillas para el caso de caoba en cajas de Petri estériles con papel filtro, a cada caja Petri se le adicionó 5 mL de la solución contaminante en las 3 concentraciones y agua destilada para el caso del control, teniendo un total de 4 tratamientos: T1: Semillas con agua destilada (Control), T2: Semillas + 1 mg de glifosato kg⁻¹, T3: Semillas + 3 mg glifosato kg⁻¹ y T4: Semillas + 80 mg glifosato kg⁻¹, las cajas fueron colocadas en incubación a 30°C y distribuidas aleatoriamente.

Cada tratamiento se realizó por triplicado. Se midió diariamente la longitud de la radícula, longitud del hipocótido de la planta, número de semillas germinadas y el % del índice de germinación (IG) fue calculado por la ecuación de More, (1985) [Ec.1].

Los resultados del índice de germinación se evaluaron de acuerdo con la clasificación de Zucconi *et al.*, (1981) el cual da tres categorías de fitotoxicidad: 1) **Severa** cuando el índice de germinación es menor al 50%, 2) **Moderada** cuando se encuentra entre 50 y 80 % y 3) **Leve** cuando es mayor a 80%.

[Ec. 1]

$$IG = \frac{\frac{NSG (muestra)}{N}}{\frac{NSG (control)}{N}} * \frac{\frac{LTRSG (muestra)}{NSG (muestra)}}{\frac{LTRSG (control)}{NSG (control)}}$$

Donde:

IG = Índice de germinación

N = Número de semillas colocadas en la caja Petri

NSG = Número de semillas germinadas

LTRSG = Largo total de la raíz de las semillas germinadas

7.3 Incubación del suelo

En condiciones de laboratorio, el suelo se incubó por un periodo de 42 días a una temperatura de 25°C y en obscuridad, la incubación consistió en colocar en recipientes de vidrio (2 L) un frasco con el tratamiento a evaluar y un vial con 20 mL de hidróxido de sodio (NaOH), a cada frasco se le adicionó 2 mL de agua destilada para mantener la humedad y se mantuvieron cerrados durante el período del experimento (Fig. 5).



Figura 5: Esquema de la incubación del suelo.

De acuerdo con las características de cada tratamiento se colocaron 30 g de suelo y 2.27 g de biosólido, la cantidad de biosólido fue respecto a utilizar una dosis de 400 kg N ha^{-1} calculado de acuerdo con el rendimiento promedio de la planta de jamaica y a sus requerimientos nutricionales de N (USDA, 2010), se evaluaron tres concentraciones del herbicida en los siguientes tratamientos, bajo un diseño experimental de bloques al azar.

- T1: Suelo sin glifosato y sin biosólido (Control)
- T2: Suelo + $1 \text{ mg glifosato kg}^{-1}$
- T3: Suelo + $3 \text{ mg glifosato kg}^{-1}$
- T4: Suelo + $80 \text{ mg glifosato kg}^{-1}$
- T5: Suelo + biosólido
- T6: Suelo + biosólido con $1 \text{ mg glifosato kg}^{-1}$
- T7: Suelo + biosólido con $3 \text{ mg glifosato kg}^{-1}$
- T8: suelo + biosólido con $80 \text{ mg glifosato kg}^{-1}$

Cada tratamiento se realizó por triplicado, es decir que se tomaron 3 unidades experimentales por cada día de muestro incluyendo los blancos para la determinación de CO₂, teniendo un total de 162 unidades experimentales. Los muestreos se realizaron los días 0, 3, 7, 14, 28 y 42 posterior al inicio del experimento para todas las variables.

Todos los parámetros fueron evaluados mediante técnicas colorimétricas: Amonio, nitritos y nitratos (APHA, 1983), actividad enzimática por la técnica de diacetato de fluoresceína (DAF) (Adam y Duncan 2001) y, la producción de CO₂ (Jenkinson y Powlson, 1976). Las técnicas se describen en el anexo B.

7.4 Ensayo en macetas

Se utilizó la planta de jamaica por ser un cultivo importante en la región, se evaluó la aplicación del biosólido y glifosato en actividad microbiana y enzimática en el suelo y el efecto sobre la planta. Se utilizó un diseño experimental de bloques aleatorizado, con los siguientes tratamientos.

T1: Suelo sin glifosato y sin biosólido (Control)

T2: Suelo + 2L glifosato en 100 L de agua (1.9%)

T3: Suelo + 1L glifosato en 100 L de agua (0.9%)

T4: Suelo + 4 L glifosato en 100 L de agua (3.8%)

T5: Suelo + biosólido sin glifosato

T6: Suelo + biosólido + 2L glifosato en 100 L de agua (1.9%)

T7: Suelo + biosólido + 1L glifosato en 100 L de gua (0.9%)

T8: Suelo + biosólido + 4L glifosato en 100 L de agua (3.8%)

De acuerdo con las características de cada tratamiento se colocaron 4 kg de suelo y 340.8 g de biosólido. La cantidad de biosólido fue en la misma proporción que en el experimento de incubación (400 kg N ha⁻¹).

Las concentraciones del herbicida utilizadas fueron calculadas con respecto a lo indicado en el marbete del producto comercial glifosato/agua (v/v), el cual fue aplicado una sola vez mediante aspersión sobre plantas de jamaica (simulando que fuese maleza presente en el suelo).

Las plantas de jamaica murieron al día siguiente de haber aplicado el herbicida, una semana después se limpió el suelo de la planta muerta y se sembró de nuevo el cultivo de interés (jamaica). Las semillas de jamaica se sembraron en bolsas de siembra con capacidad de 4 kg de suelo y en cada bolsa se colocaron 10 semillas, cada tratamiento contó con 5 réplicas teniendo un total de 40 unidades experimentales y 400 plantas de jamaica las cuales fueron colocadas a la intemperie en la universidad del Mar, campus Puerto Ángel. Este ensayo se realizó en época de lluvias por lo cual las plantas no fueron regadas frecuentemente de manera manual.

Las variables medidas fueron: altura de la planta (cm), clorofila (Arnon, 1949), actividad enzimática del suelo, amonio, nitritos y nitratos por las técnicas antes descritas, actividad β -glucosidasa (Masciandaro *et al.*, 1994), actividad fosfatasa (Tabatabai y Bremner, 1969), actividad deshidrogenasa (García *et al.*, 1993) y antocianinas en hojas y cáliz de la jamaica. Las técnicas se describen en el anexo B.

Para las antocianinas se realizó una extracción de acuerdo con Hong y Wrolstad, (1990), posteriormente se midió a una longitud de onda de 546 y 535 para delfinidina y cianidina. Para su cuantificación se utilizaron cianidina y delfinidina como estándares y se elaboró una curva de calibración.

La altura de la planta se midió semanalmente, tomando una planta por cada maceta y para las demás variables se realizó un muestreo destructivo de la planta del cual se tomaron 3 g en peso fresco de hoja a una altura media de la planta y aproximadamente 10 g de suelo cerca de la raíz (5 a 10 cm de profundidad), es decir, cada día de muestreo se retiró una planta de cada maceta. El muestreo se realizó cada 15 días durante 3 meses.

7.5 Análisis de datos

Los datos obtenidos se analizaron con el programa Statistica 7. Las pruebas de toxicidad en semillas se evaluaron mediante análisis de varianza de 1 vía. Los resultados de la incubación del suelo y el ensayo de invernadero se evaluaron con un análisis de varianza de medidas repetidas, se utilizó la prueba de Fisher para ver la diferencia entre tratamiento con un nivel $\alpha=0.05$.

8 RESULTADOS

8.1 Toxicidad del glifosato en semillas de jamaica y caoba

Las semillas utilizadas en este experimento presentaron un porcentaje de germinación mayor del 90 %, lo cual es válido para evaluar efectos en su germinación.

Para calcular el IG se midió la longitud de la raíz y del epicótilo de las semillas de caoba y jamaica, los promedios de ambas se muestran en el cuadro 7. Para las semillas de caoba el glifosato inhibió la longitud de la raíz hasta un 85.75% en la concentración más alta (80 mg kg^{-1}), 75.96% y 46.17% a una concentración de 3 y 1 mg kg^{-1} respectivamente. Respecto a la longitud del epicótilo de las semillas de caoba también mostraron un porcentaje de inhibición respecto al control de 27.21 y 43.61% a la concentración de 1 y 3 mg kg^{-1} de glifosato respectivamente y una inhibición total del hipocótilo a una concentración de 80 mg kg^{-1} lo que resultó muy dañino para esta especie.

En el caso de las semillas de jamaica, también mostraron un efecto negativo del glifosato al inhibir un 40.53% (1 mg kg^{-1}), 59.2% (3 mg kg^{-1}) y 68.84 % (80 mg kg^{-1}) la longitud de la raíz respecto al control sin glifosato (cuadro 5). En lo que respecta a la altura de la plántula también se vio afectada negativamente, el tratamiento control presentó el valor más alto con un promedio de 2.5 cm, con la concentración de 1 mg kg^{-1} de glifosato llegó solo a 1.6 cm, a la concentración de 3 mg kg^{-1} obtuvo una altura de 0.96 cm y finalmente a la concentración de 80 mg kg^{-1} el glifosato inhibió el crecimiento un 65 % llegando a tener un promedio de 0.87 cm de altura, todo esto en un tiempo de germinación de 4 días.

Cuadro 5: Longitud promedio de la raíz y del epicótilo en semillas de caoba y jamaica en 3 concentraciones de glifosato.

Tratamientos	Caoba			Jamaica		
	% G	L.R	A.E	% G	L.R	A.E
0 mg	96	6.62 ± 1.17	2.22 ± 0.36	91	3.68 ± 0.67	2.51 ± 0.93
1 mg	97	3.56 ± 0.59	1.61 ± 0.17	82	2.19 ± 0.35	1.61 ± 0.43
3 mg	100	1.59 ± 0.32	1.25 ± 0.18	83	1.50 ± 0.36	0.96 ± 0.29
80 mg	100	0.94 ± 0.08	0 ± 0	87	1.14 ± 0.23	0.87 ± 0.25

% G: germinación, L.R: Longitud radicular, A.E: Altura del epicótilo, en cm.

De acuerdo a los valores del IG (cuadro 6), el glifosato tuvo para ambas especies una toxicidad moderada a una concentración de 1 mg kg⁻¹ y severa cuando se aplican 3 y 80 mg kg⁻¹, sin embargo, las semillas de caoba fueron más susceptibles al efecto del herbicida presentando una mayor inhibición en el crecimiento de la raíz y del epicótilo a medida que aumentó la concentración del glifosato.

Cuadro 6: Porcentaje del índice de germinación en semillas de jamaica y caoba con 3 concentraciones de glifosato

Tratamiento	% Índice de germinación (IG)		Fitotóxicidad
	jamaica	caoba	
1 mg	59	54	Moderada
3 mg	41	24	Severa
80 mg	31	14	Severa

8.2 Efecto en la actividad microbiana del suelo

8.2.1 Respiración microbiana

El análisis de medidas repetidas arrojó diferencias significativas $F(7.9)=35.80$, $p<0.05$ entre los tratamientos en las diferentes concentraciones del herbicida y la aplicación del biosólido (Fig. 6). A lo largo del experimento la producción de CO_2 fue incrementando en todos los tratamientos, en promedio los tratamientos con biosólido tuvieron la mayor producción de CO_2 total al final del experimento ($0.4 \pm 0.06 \text{ mg g}^{-1}$) en comparación con los tratamientos sin biosólido ($0.2 \pm 0.05 \text{ mg g}^{-1}$), es decir, en éste trabajo el biosólido promovió la respiración microbiana del suelo aumentando el doble la producción de CO_2 en comparación al suelo sin biosólido.

La presencia del glifosato también estimuló la respiración microbiana y fue cada vez mayor al aumentar la dosis de este herbicida. En los tratamientos sin biosólido (Fig. 7), el T2, T3 y T4 que corresponden a 1, 3 y 80 mg kg^{-1} respectivamente estimularon en 1, 1.46 y 1.8 veces más que el control (T1); en cambio, en el tratamiento con biosólido y la menor concentración de glifosato (T6) redujo la producción de CO_2 un 8% respecto al control, y en las concentraciones de 3 mg kg^{-1} (T7) y 80 mg kg^{-1} (T8) aumentó 1.13 y 1.2 veces más, respectivamente. (Fig. 8).

El tratamiento con mayor producción de CO_2 fue el T8 con un promedio de 0.47 mg g^{-1} , y el de menor producción fue el T1 con un promedio de 0.15 mg g^{-1} de CO_2 .

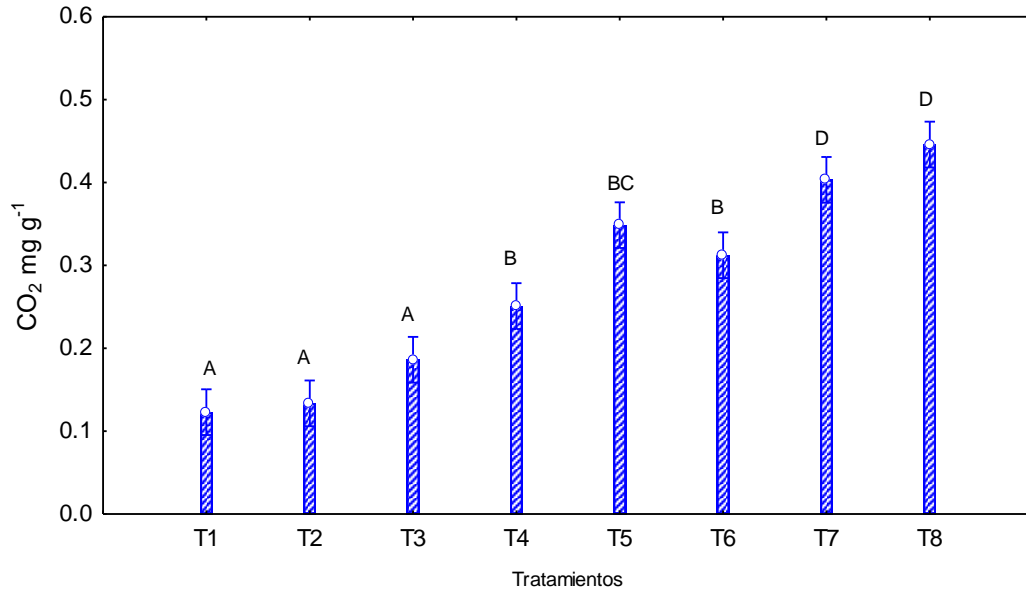


Figura 6: Concentración promedio de los muestreos de dióxido de carbono en la incubación del suelo: (T1) Suelo (Control), (T2) Suelo + 1 mg kg⁻¹ glifosato, (T3) Suelo + 3 mg kg⁻¹ glifosato, (T4) Suelo + 80 mg kg⁻¹ glifosato, (T5) Suelo + biosólido, (T6) Suelo + biosólido con 1 mg kg⁻¹ glifosato, (T7) Suelo + biosólido con 3 mg kg⁻¹ glifosato, (T8) suelo + biosólido con 80 mg kg⁻¹ glifosato. Letras diferentes indica diferencias significativas. $F(7.9) = 35.80$, ($p < 0.05$).

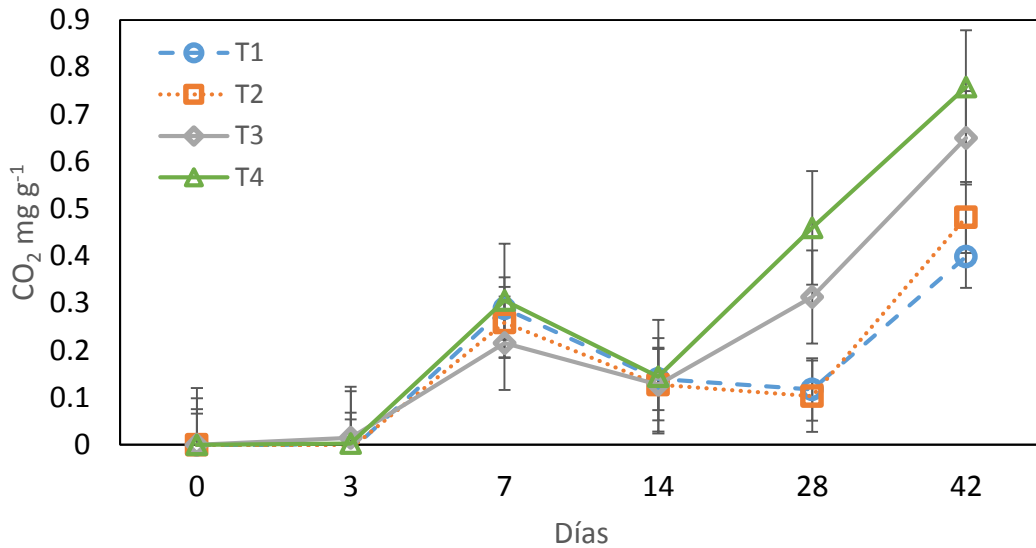


Figura 7: Producción de CO₂ acumulada durante la cinética de 42 días: (T1) Suelo (Control), (T2) Suelo + 1 mg kg⁻¹ glifosato, (T3) Suelo + 3 mg kg⁻¹ glifosato, (T4) Suelo + 80 mg kg⁻¹ glifosato.

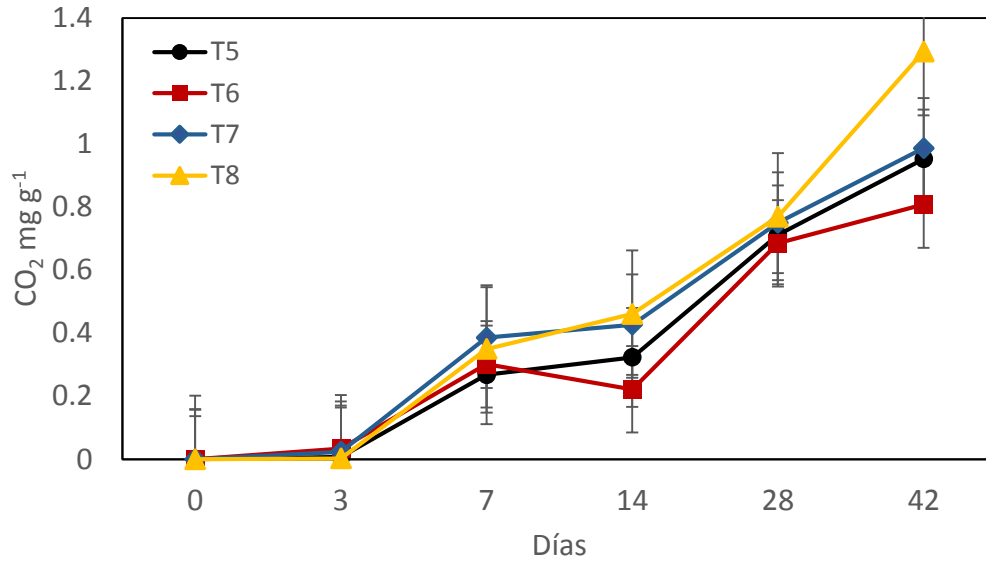


Figura 8: Producción de CO_2 acumulada durante la cinética de 42 días: (T5) Suelo + biosólido, (T6) Suelo + biosólido con 1 mg kg^{-1} glifosato, (T7) Suelo + biosólido con 3 mg kg^{-1} glifosato, (T8) suelo + biosólido con 80 mg kg^{-1} glifosato

8.2.2 Amonio en el suelo

En el ensayo de incubación del suelo. El análisis estadístico arrojó diferencias significativas ($F(10.16) = 35.32, p < 0.05$) entre tratamientos donde se aplicó el herbicida a mayor concentración (80 mg kg^{-1}) con y sin biosólido, sin embargo no mostró diferencias significativas entre los tratamientos sin biosólido (T1 al T3) al aplicar una concentración de 1 y 3 mg kg^{-1} de glifosato, por el contrario los tratamientos con biosólido al aplicar estas mismas concentraciones si muestran diferencias significativas respecto al control (Fig. 9).

La concentración de amonio disminuyó a lo largo del experimento con excepción del T4 y T8 en donde aumentó con el paso del tiempo, estos tratamientos tuvieron la mayor concentración de amonio con un promedio de 7.64 y 8.57 mg kg^{-1} respectivamente, mientras que el T1, T2 y T3 estuvieron en un intervalo de 2.12 a 2.18 mg kg^{-1} y el T5, T6 y T7 estuvieron entre 2.54 y 4.40 mg kg^{-1} de amonio. Cabe mencionar que los controles estuvieron por debajo de los tratamientos con herbicida (Fig. 10 y 11).

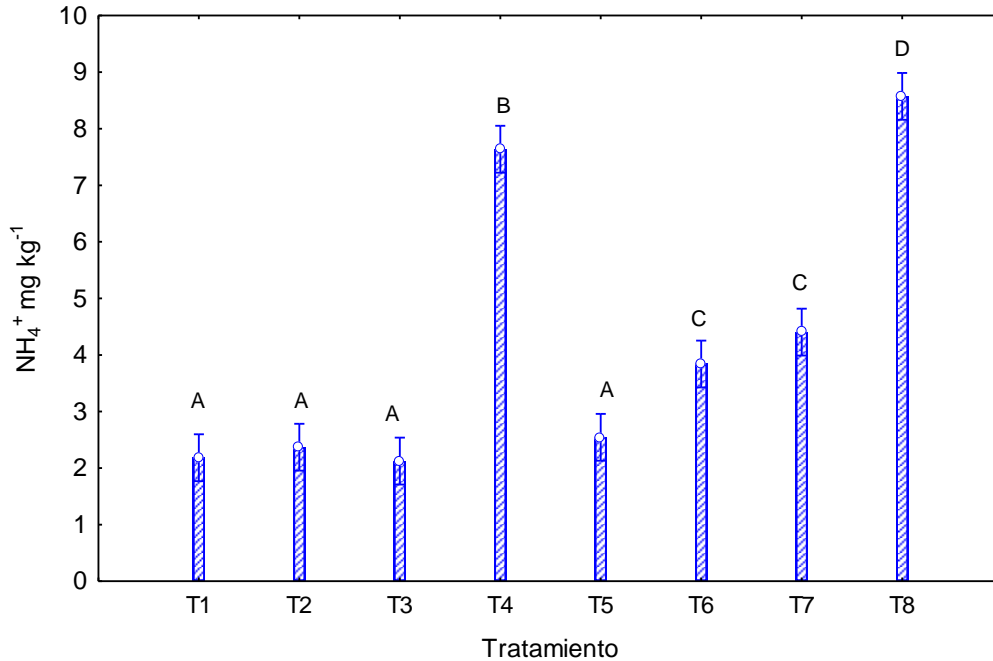


Figura 9: Concentración promedio de los muestreos de amonio en la incubación del suelo: (T1) Suelo (Control), (T2) Suelo + 1 mg kg⁻¹ glifosato, (T3) Suelo + 3 mg kg⁻¹ glifosato, (T4) Suelo + 80 mg kg⁻¹ glifosato, (T5) Suelo + biosólido, (T6) Suelo + biosólido con 1 mg kg⁻¹ glifosato, (T7) Suelo + biosólido con 3 mg kg⁻¹ glifosato, (T8) suelo + biosólido con 80 mg kg⁻¹ glifosato. Letras diferentes indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

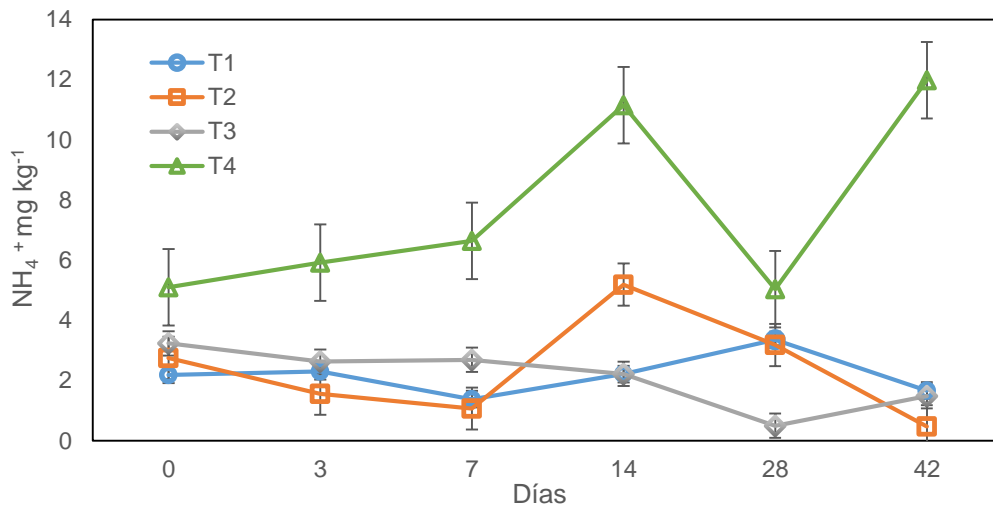


Figura 10: Concentración de amonio en tratamientos sin biosólido durante la cinética de 42 días: (T1) Suelo sin glifosato y sin biosólido (Control), (T2) Suelo + 1 mg kg⁻¹ glifosato, (T3) Suelo + 3 mg kg⁻¹ glifosato, (T4) Suelo + 80 mg kg⁻¹ glifosato.

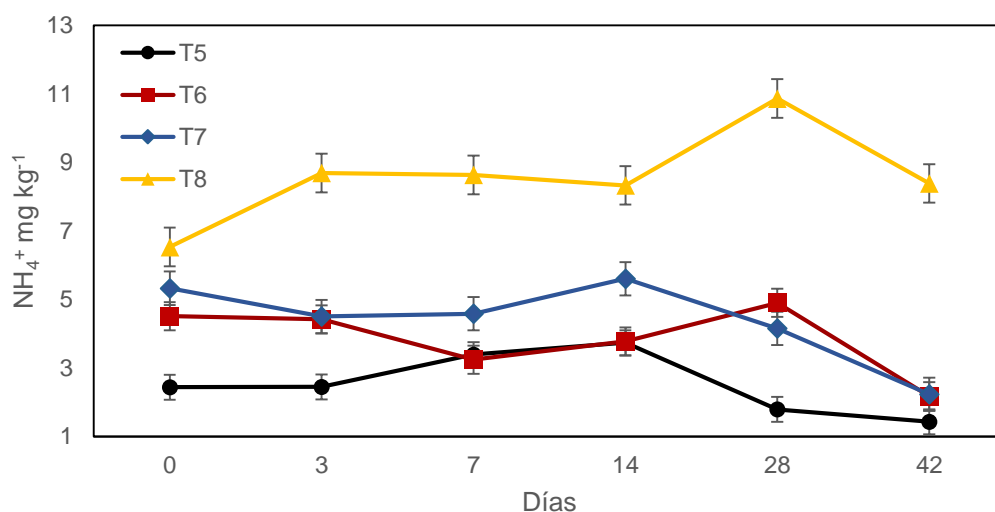


Figura 11: Concentración de amonio en tratamientos con biosólido durante la cinética de 42 días: (T5) Suelo + biosólido, (T6) Suelo + biosólido con 1 mg kg⁻¹ glifosato, (T7) Suelo + biosólido con 3 mg kg⁻¹ glifosato, (T8) suelo + biosólido con 80 mg kg⁻¹ glifosato

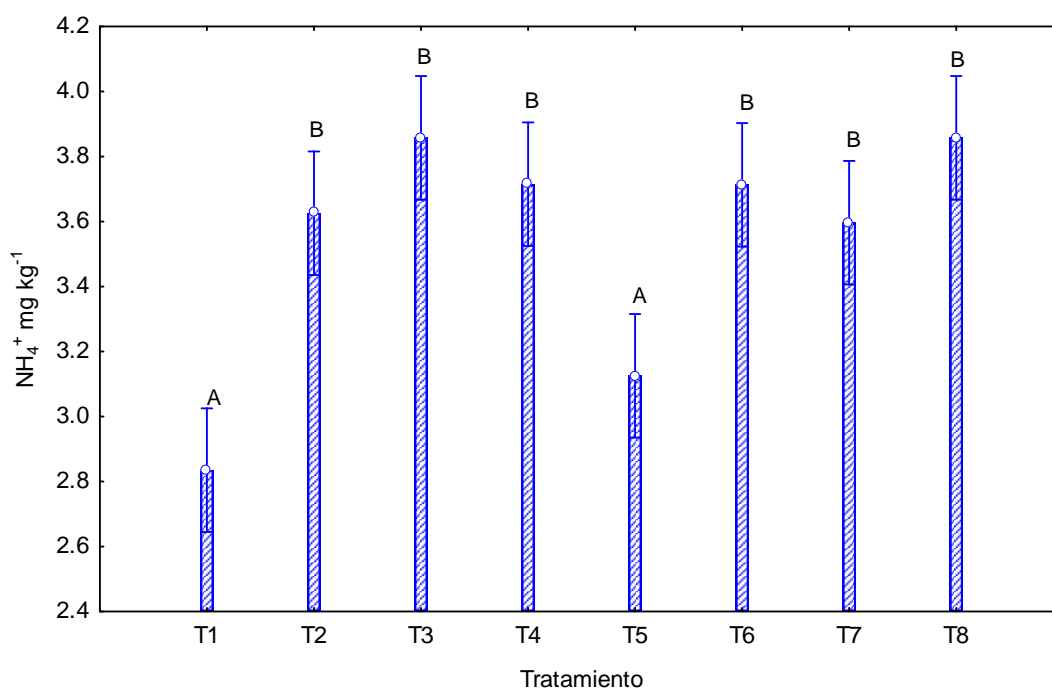


Figura 12: Concentración promedio de los muestreos de amonio en el suelo en el ensayo en macetas: T1: Control, T2: S + G 1.9%, T3: S + G 0.9%, T4: S + G 3.8%, T5: S + B, T6: S + B + G 1.9%, T7: S + B + G 0.9%, T8: S + B + G 3.8%. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

En el ensayo en macetas, la cantidad de amonio en el suelo mostró diferencias significativas ($F(16.9) = 42.67, p < 0.05$) al aplicar el glifosato, independientemente de la concentración utilizada este aumentó 1.24 veces más la cantidad de amonio en el suelo respecto a los controles (T1 y T5) que no contienen glifosato (Fig. 12). Los tratamientos con glifosato (T2 al T4 y T6 al T8) tuvieron en promedio 3.72 mg kg^{-1} de amonio mientras que los tratamientos sin glifosato (T1 y T5) tuvieron en promedio 2.98 mg kg^{-1}

8.2.3 Nitritos en el suelo

En la incubación del suelo, a lo largo del experimento la concentración de nitritos tuvo un comportamiento semejante a la concentración de amonio, el T4 y el T8 tuvieron la mayor concentración de nitritos con un promedio de 15.4 y 15.9 mg kg^{-1} respectivamente. Los valores estadísticos fueron $F(18.5) = 35.32, p < 0.05$.

Los tratamientos sin biosólido (Fig. 13) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el T1, T2 y T3 manteniéndose en un intervalo de 3.37 a 3.42 mg kg^{-1} , sin embargo, el T4 si muestra una gran diferencia, ya que a partir del día 3 de muestreo la concentración de nitritos en el suelo fue aumentando progresivamente, al final del experimento (día 42) tuvo una concentración de 4.9 veces más que el día 0.

Los tratamientos con biosólido (Fig. 14), el T8 fue el único que mostró diferencia significativa respecto al T5, T6, y T7, la concentración de nitritos en el T8 también fue en aumento con el transcurso de los días, al final (día 42) tuvo una concentración de 1.4 veces más que el día 0, los demás tratamientos (T5 al T7) estuvieron en un intervalo de 4.1 a 6.18 mg kg^{-1} .

De acuerdo con lo anterior los resultados no mostraron diferencias significativas en la concentración de nitritos al utilizar o no el biosólido, y tampoco al utilizar una concentración 1 y 3 mg de glifosato; sino que el efecto sobre los microorganismos oxidadores de nitritos se reflejó al utilizar una concentración de 80 mg kg^{-1} de glifosato

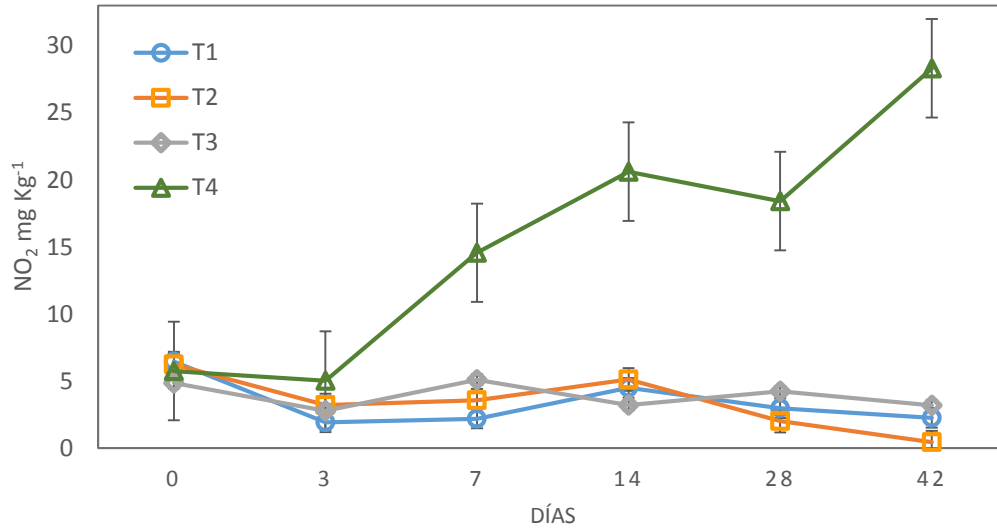


Figura 13: Concentración de nitritos en tratamientos sin biosólido durante la cinética de 42 días: (T1) Suelo sin glifosato y sin biosólido (Control), (T2) Suelo + 1 mg kg⁻¹ glifosato, (T3) Suelo + 3 mg kg⁻¹ glifosato, (T4) Suelo + 80 mg kg⁻¹ glifosato.

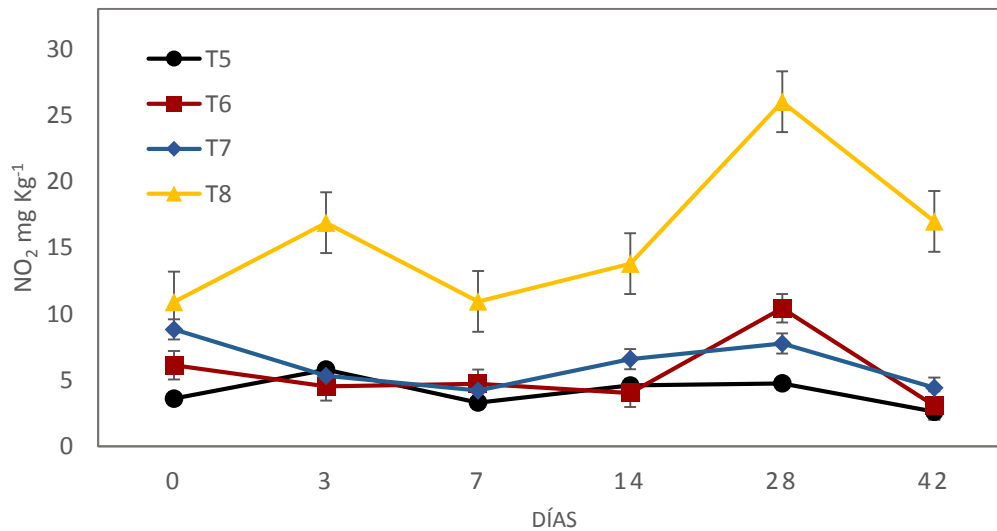


Figura 14: Concentración de nitritos en tratamientos con biosólido durante la cinética de 42 días: (T5) Suelo + biosólido, (T6) Suelo + biosólido con 1 mg kg⁻¹ glifosato, (T7) Suelo + biosólido con 3 mg kg⁻¹ glifosato, (T8) suelo + biosólido con 80 mg kg⁻¹ glifosato.

En el ensayo en macetas, los valores estadísticos fueron $F(11.99) = 42.67$, $p < 0.05$, la concentración de nitritos no presentó diferencias significativas en los tratamientos sin biosólido al aplicar el herbicida respecto al control, todos estuvieron en un intervalo de 2.03 a 2.23 mg kg^{-1} de nitritos; por el contrario, en los tratamientos con biosólido si hubo diferencias al aplicar el glifosato, el T7 quien tuvo la menor concentración de glifosato (0.9%) no presentó diferencia significativa con respecto al control (T5), pero el T6 y T8 quienes tienen una concentración media (1.9%) y alta (3.8%) de glifosato, presentaron diferencias respecto al control ya que tuvieron una cantidad de nitritos de 1.3 veces mayor. El T6 y T8 tuvieron la mayor concentración de nitritos con un promedio de 3.85 y 3.79 mg kg^{-1} respectivamente (Fig.15).

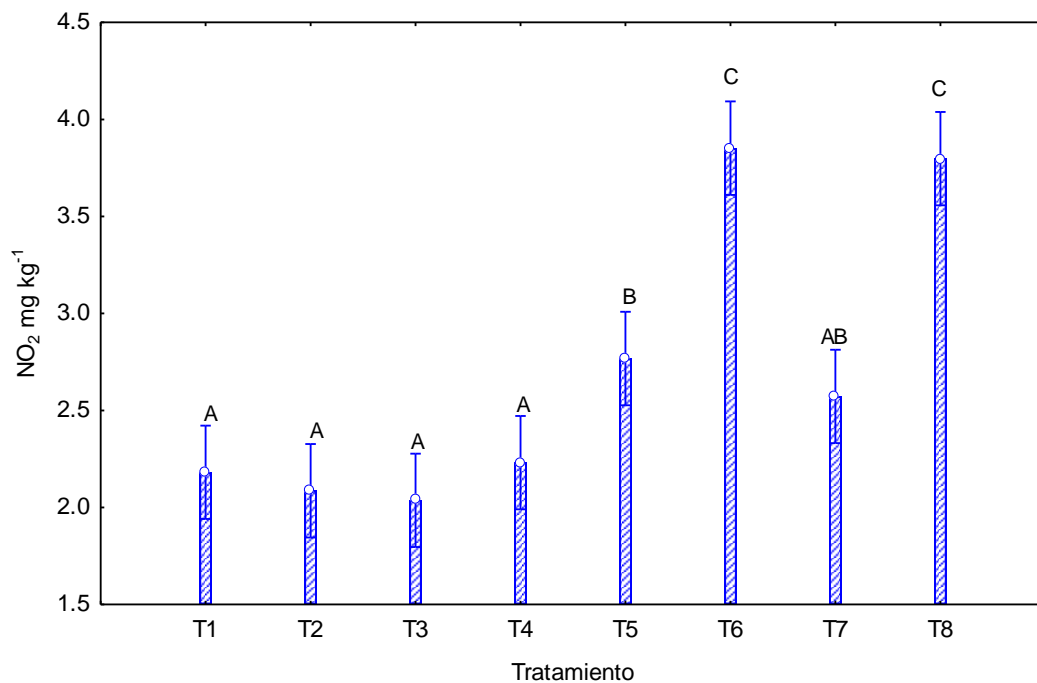


Figura 15: Concentración promedio de los muestreos de nitritos en el suelo del ensayo en macetas: T1: Control, T2: S + G 1.9%, T3: S + G 0.9%, T4: S + G 3.8%, T5: S + B, T6: S + B + G 1.9%, T7: S + B + G 0.9%, T8: S + B + G 3.8%. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

8.2.4 Nitratos en el suelo

En la incubación del suelo, la concentración de nitratos a lo largo del experimento fue aumentando en todos los tratamientos, de acuerdo con el análisis estadístico realizado existen diferencias significativas entre las concentraciones del herbicida utilizado y el uso del biosólido, $F(26.27) = 35.32$, $p < 0.05$.

En los tratamientos sin biosólido (Fig. 16) mostró diferencias significativas al utilizar 1 mg (T2) y 3 mg (T3) de glifosato, la concentración promedio de los muestreos de nitratos a lo largo del experimento fue de 107.4 y 116.1 mg kg⁻¹ respectivamente; estos tratamientos aumentaron 2 veces más la cantidad de nitratos respecto al control (52.43 mg kg⁻¹); por el contrario el T4 quien tiene la mayor concentración del herbicida (80 mg) tuvo la menor concentración de nitratos con un promedio de 15.82 mg kg⁻¹, este valor es 3.3 veces inferior al tratamiento control (T1).

Respecto a los tratamientos con biosólido (T5 al T8) mostraron diferencias significativas entre todos los tratamientos: $T6 > T5 > T7 > T8$ con un promedio de 966.38, 909.97, 872.02 y 271.49 mg kg⁻¹ respectivamente.

De acuerdo con lo anterior, la concentración mínima del herbicida (T6) aumentó 1.06 veces más la concentración de nitratos respecto al control, una concentración media (T7) disminuyó un 4.1% y al utilizar una mayor concentración (T8) el efecto negativo es evidente ya que disminuyó hasta un 70.1 % la cantidad de nitratos en el suelo (Fig. 17). A pesar de que el glifosato causó una disminución de nitratos en tratamientos con y sin biosólido, la cantidad de nitratos en los tratamientos con biosólido fue 10.3 veces mayor con un promedio de 754.94 mg kg⁻¹ en comparación de los tratamientos sin biosólido que tienen en promedio 72.95 mg kg⁻¹ de nitratos.

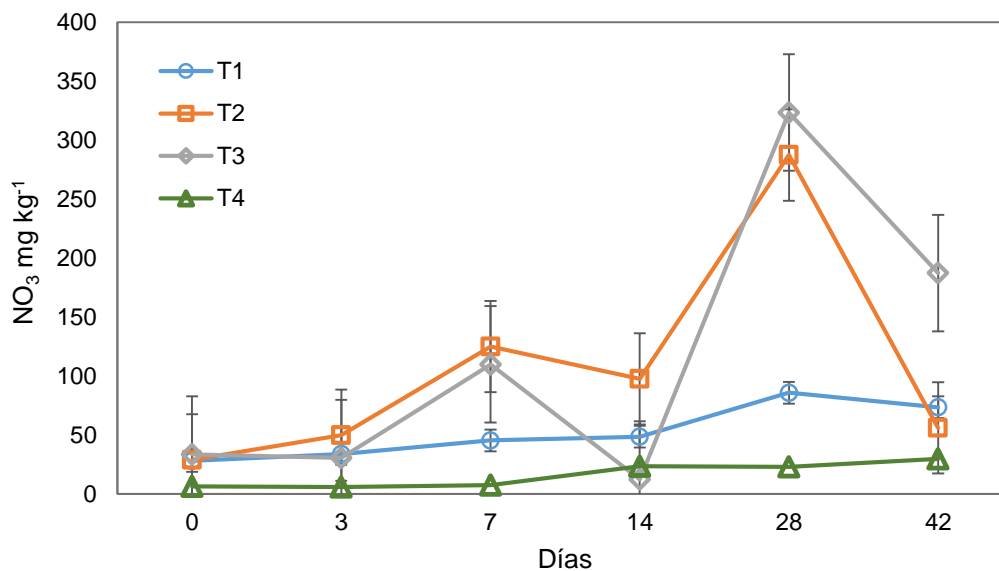


Figura 16: Concentración de nitratos en tratamientos sin biosólido en la cinética de 42 días: (T1) Suelo sin glifosato y sin biosólido (Control), (T2) Suelo + 1 mg kg⁻¹ glifosato, (T3) Suelo + 3 mg kg⁻¹ glifosato, (T4) Suelo + 80 mg kg⁻¹ glifosato.

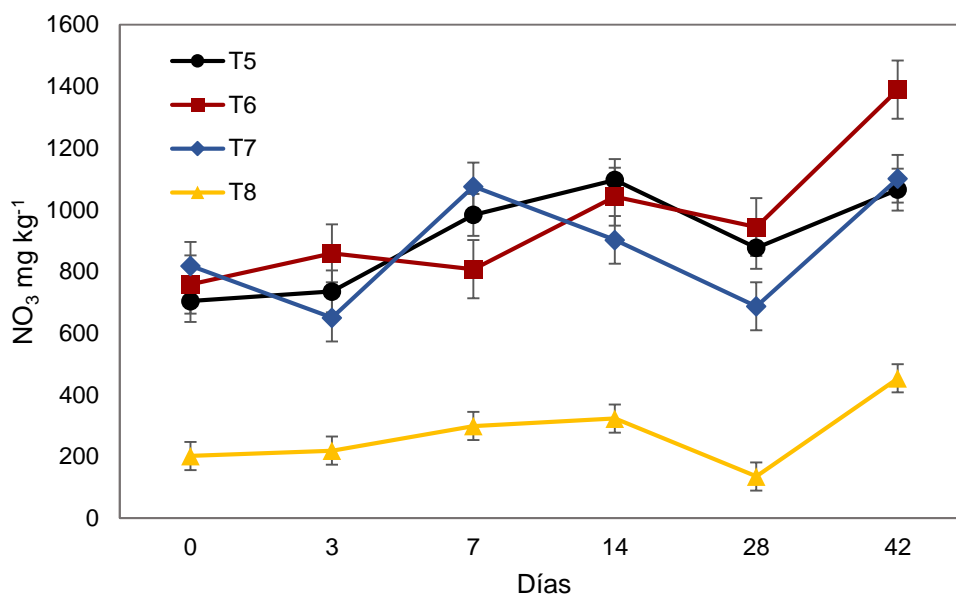


Figura 17: Concentración de nitratos en tratamientos con biosólido en la cinética de 42 días: (T5) Suelo + biosólido, (T6) Suelo + biosólido con 1 mg kg⁻¹ glifosato, (T7) Suelo + biosólido con 3 mg kg⁻¹ glifosato, (T8) suelo + biosólido con 80 mg kg⁻¹ glifosato

8.2.5 Actividad enzimática (DAFt)

La tasa neta de liberación de fluoresceína (DAFt) en la incubación del suelo fue variada en cada día de muestreo y al final del experimento (día 42) disminuyó en casi todos los tratamientos, excepto el T4 y el T7 que se mantuvieron constantes con valores de 1364 a 1344 mg kg⁻¹h⁻¹ para el T4 y entre 1113 y 1244 mg kg⁻¹h⁻¹ el T7 (Fig. 16 y 17). El T4 estuvo por arriba de todos los demás tratamientos con un promedio de 1431.39 DAFt mg kg⁻¹h⁻¹, seguido del T8 y T7 con un promedio de 1085.33 y 1041.99 DAFt mg kg⁻¹h⁻¹, respectivamente; cabe mencionar que estos son los tratamientos con la mayor concentración del herbicida (80 mg kg⁻¹)

El efecto del glifosato sobre la actividad enzimática en los tratamientos sin biosólido (Fig. 18) fue a corto plazo, mayormente afectada en el día 3 de muestreo, el T1, T2 y T3 tuvieron una disminución del 90, 60 y 82 % respectivamente mientras que el T4 aumentó su concentración con relación al valor que presentó en el día 0 de muestreo.

Los tratamientos con biosólido (T5 al T8) tuvieron un comportamiento distinto a los tratamientos sin biosólido, el T5 y T6 tuvieron una disminución durante los primeros siete días de incubación, a pesar que la concentración inicial de diacetato de fluoresceína del T6 fue menor al T5 (control) después de los siete días fue igual, el T8 quien inicialmente tuvo una concentración de DAFt mayor que el T5, T6 y T7 fue disminuyendo durante el periodo de incubación quedando finalmente por debajo de T7. El T7 y T8 tuvieron una concentración 2.1 veces más en comparación al control. Estos tratamientos con biosólido tuvieron una concentración de DAFt 1.3 veces más que los tratamientos sin biosólido (Fig. 19), las diferencias significativas se muestran en la Fig. 20, $F(14,78) = 35.32$, $p < 0.05$.

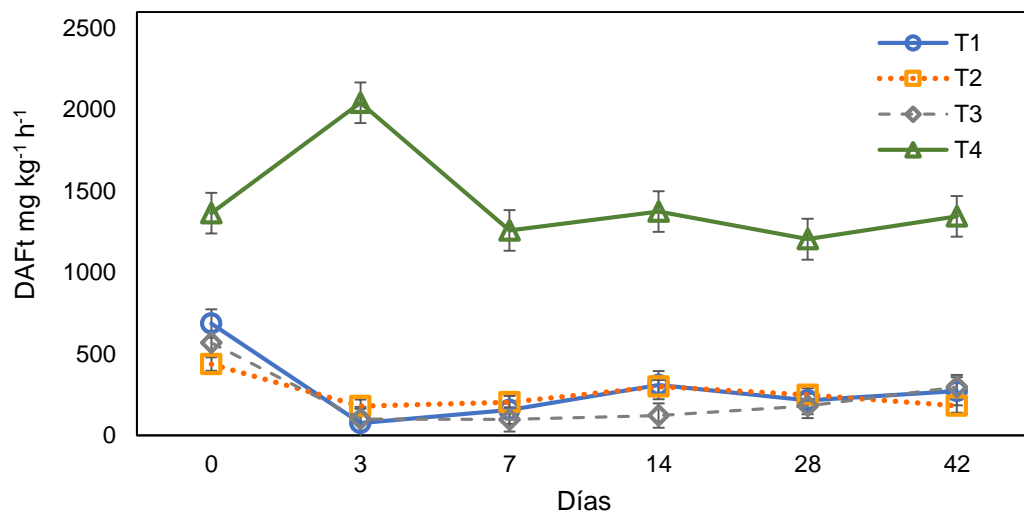


Figura 18: Tasa neta de liberación de fluoresceína en tratamientos sin biosólido durante la cinética de 42 días: (T1) Suelo (Control), (T2) Suelo + 1 mg kg⁻¹ glifosato, (T3) Suelo + 3 mg kg⁻¹ glifosato, (T4) Suelo + 80 mg kg⁻¹ glifosato.

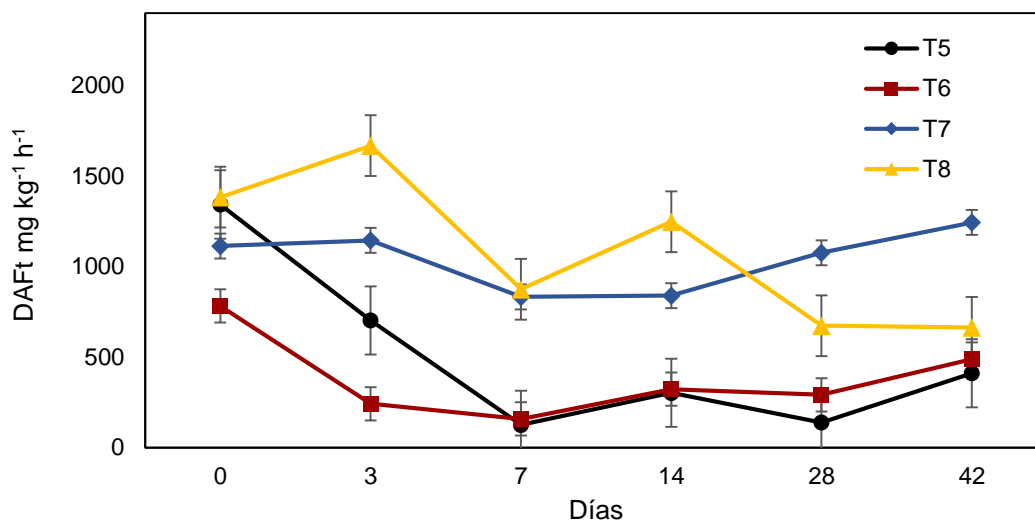


Figura 19: Tasa neta de liberación de fluoresceína en tratamientos con biosólido durante la cinética de 42 días: (T5) Suelo + biosólido, (T6) Suelo + biosólido con 1 mg kg⁻¹ glifosato, (T7) Suelo + biosólido con 3 mg kg⁻¹ glifosato, (T8) suelo + biosólido con 80 mg kg⁻¹ glifosato.

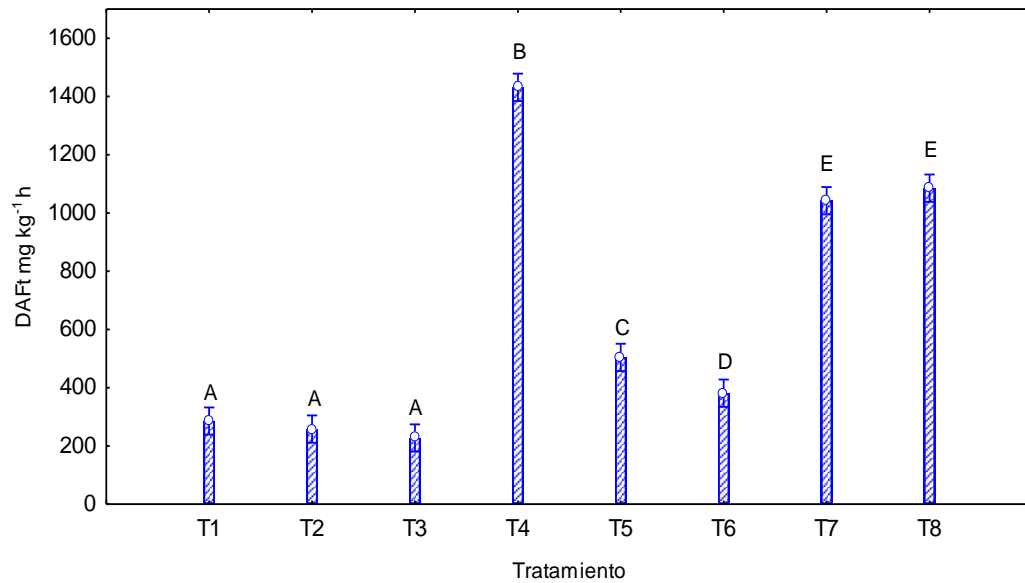


Figura 20: Tasa neta promedio de liberación de fluoresceína durante la incubación del suelo: Suelo (Control), (T2) Suelo + 1 mg kg⁻¹ glifosato, (T3) Suelo + 3 mg kg⁻¹ glifosato, (T4) Suelo + 80 mg kg⁻¹ glifosato, (T5) Suelo + biosólido, (T6) Suelo + biosólido con 1 mg kg⁻¹ glifosato, (T7) Suelo + biosólido con 3 mg kg⁻¹ glifosato, (T8) suelo + biosólido con 80 mg kg⁻¹ glifosato. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el ensayo en macetas, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre el T1 respecto a los demás (T2 al T8) $F(11.2) = 7.11$, $p < 0.05$, es decir que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con biosólido (T5 al T8); y presentaron en promedio 869.13 DAFt mg kg⁻¹h⁻¹, por contrario, en los tratamientos sin biosólido si existe diferencia al aplicar el herbicida, ya que el T2, T3 y T4 quienes contienen glifosato tuvieron una concentración 1.5 veces más (873.26 DAFt mg kg⁻¹h⁻¹) que el control (T1) quien tuvo una concentración de 580.17 DAFt mg kg⁻¹h⁻¹, lo anterior indica que (las condiciones del experimento), el glifosato no tiene ningún efecto sobre la actividad enzimática del suelo al ser aplicado simultáneamente con el biosólido pero si muestran una estimulación al ser aplicado al suelo sin biosólido.

La tasa neta de liberación de fluoresceína (DAFt) en los tratamientos sin biosólido (T1 al T4) durante los días 30 y 45 de muestreo tuvieron un incremento de 4.5 y 5.7 veces más respecto al día 15, sin embargo el día 60 esa concentración disminuyó y fue constante durante los siguientes días (Fig. 21); respecto a los tratamientos con biosólido (T5 al T8) la concentración de DAFt fue constante hasta el día 105 de muestreo que tuvo un aumento de 2.7 veces más en comparación con los días anteriores (Fig. 22).

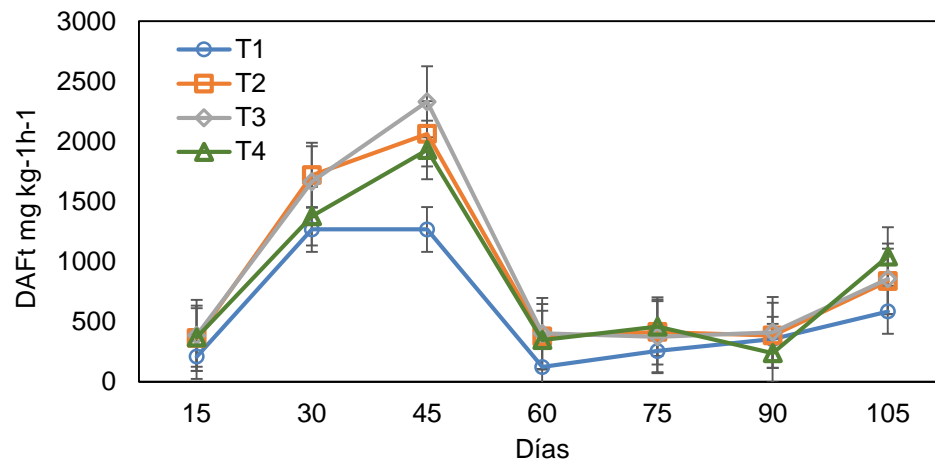


Figura 21: Tasa neta de liberación de fluoresceína en tratamientos sin biosólido en el ensayo en macetas: T1: Control, T2: S + G 1.9%, T3: S + G 0.9%, T4: S + G 3.8%.

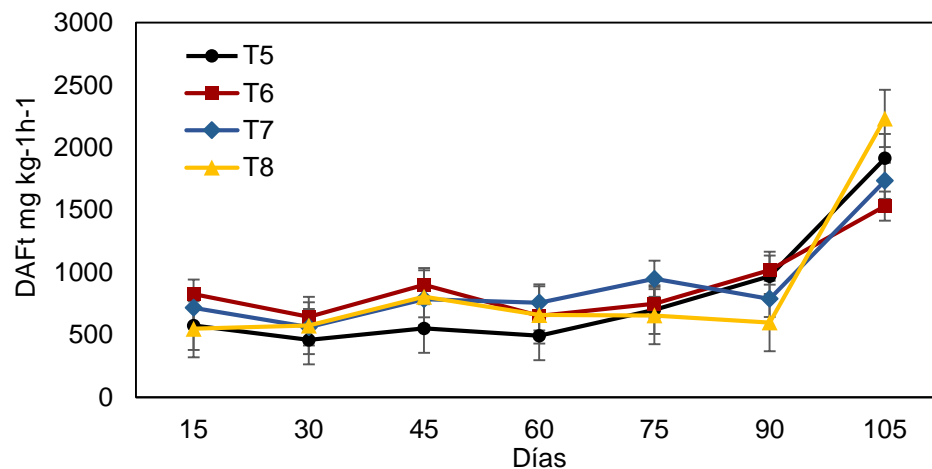


Figura 22: Tasa neta de liberación de fluoresceína en tratamientos con biosólido en el ensayo en macetas: T5: S + B, T6: S + B + G 1.9%, T7: S + B + G 0.9%, T8: S + B + G 3.8%.

8.2.6 Actividad enzimática deshidrogenasa en el suelo

La actividad deshidrogenasa aumentó a lo largo del experimento en todos los tratamientos, sin embargo, la presencia del glifosato causó una disminución conforme a la dosis aplicada, en tratamientos con o sin biosólido. (Fig. 23) El T5 tuvo la mayor actividad enzimática con 4.64 μ moles (p-nitrofenol liberado) PNF /h. g, después el T7>T1>T3>T6>T4>T2>T8 con una actividad promedio de 3.49, 3.34, 2.94, 2.85, 2.75, 2.75 y 2.43 μ moles PNF/h.g respectivamente.

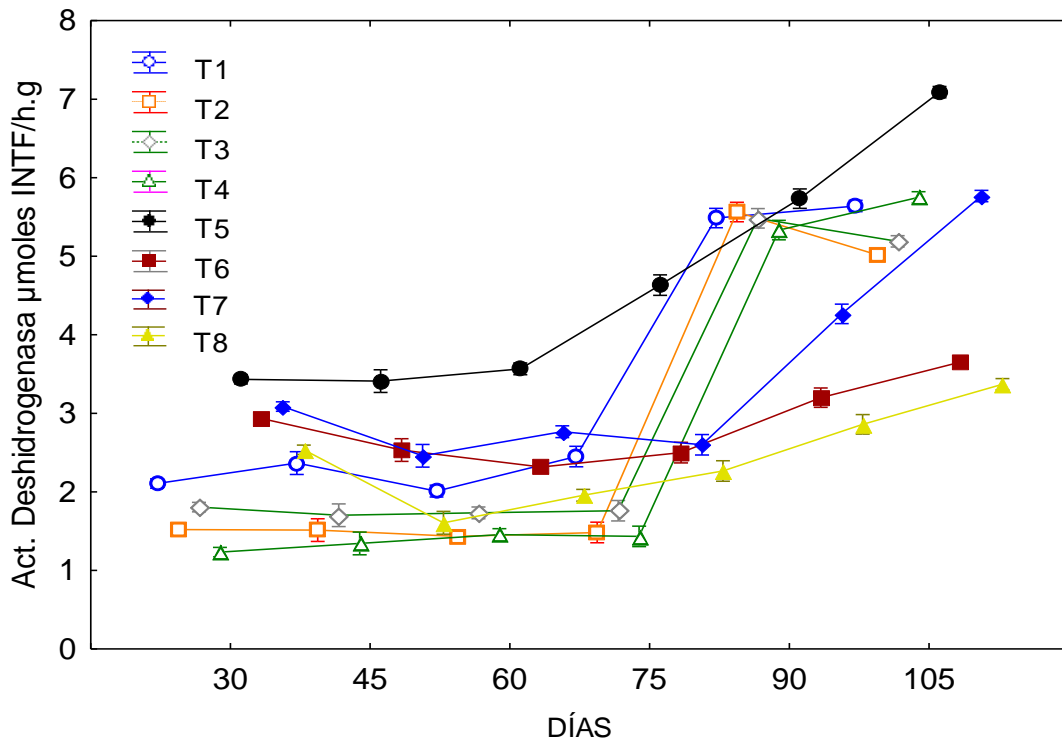


Figura 23: Actividad deshidrogenasa en el suelo del ensayo en macetas: T1: Control, T2: S + G 1.9%, T3: S + G 0.9%, T4: S + G 3.8%, T5: S + B, T6: S + B + G 1.9%, T7: S + B + G 0.9%, T8: S + B + G 3.8%.

Las dosis aplicadas de glifosato mostraron diferencias significativas ($F(236.2) = 35.80, p < 0.05$) en la actividad deshidrogenasa respecto a los controles. La concentración mínima de glifosato (0.9%) presentó una disminución del 12% en el tratamiento sin biosólido (T3) y del 24.7% en el tratamiento con biosólido (T7).

La concentración media y alta de glifosato en los tratamientos sin biosólido (T2 y T4) no mostraron diferencias entre ellos, pero tuvieron una disminución del 17.6 % respecto al control, en los tratamientos con biosólido si hubo diferencias y presentaron una disminución de 38.5 y 47.6 % respectivamente. La actividad deshidrogenasa en el suelo fue 1.13 veces mayor al aplicar el biosólido.

8.2.7 Actividad enzimática β -glucosidasa en el suelo

La aplicación del herbicida glifosato en el suelo, causó una disminución en la actividad β -glucosidasa, esta disminución fue mayor al aumentar la dosis aplicada. El T5>T7>T6>T8>T1>T3>T2>T4 con promedio de 0.89, 0.69, 0.59, 0.34, 0.31, 0.25, 0.16 y 0.15 μ moles PNF/h. g respectivamente. (Fig. 24)

La actividad β -glucosidasa en los tratamientos sin biosólido (T1 al T4) fue constante durante el experimento. El T1 (control) tuvo la mayor actividad. La mínima concentración de glifosato (0.9%) causó una disminución del 19.3 % (T3), y la concentración media y alta (1.9 y 3.8%) T2 y T4 respectivamente, presentaron una disminución del 50% respecto al control.

En los tratamientos con biosólido (T5 al T8), la actividad enzimática β -glucosidasa fue aumentando a lo largo del experimento en todos los tratamientos y existe diferencia significativa entre cada uno de ellos ($F(395.17) = 35.80, p < 0.05$). De manera decreciente el T5>T7>T6>T8, los valores promedio obtenidos se mencionaron anteriormente, estos indican una disminución en la actividad β -glucosidasa del 22.4, 33.7 y 61.7 % a una concentración de 0.9, 1.9 y 3.8% de glifosato respectivamente. Los tratamientos con biosólido presentaron una actividad β -glucosidasa 2.8 veces mayor en comparación a los tratamientos sin biosólido.

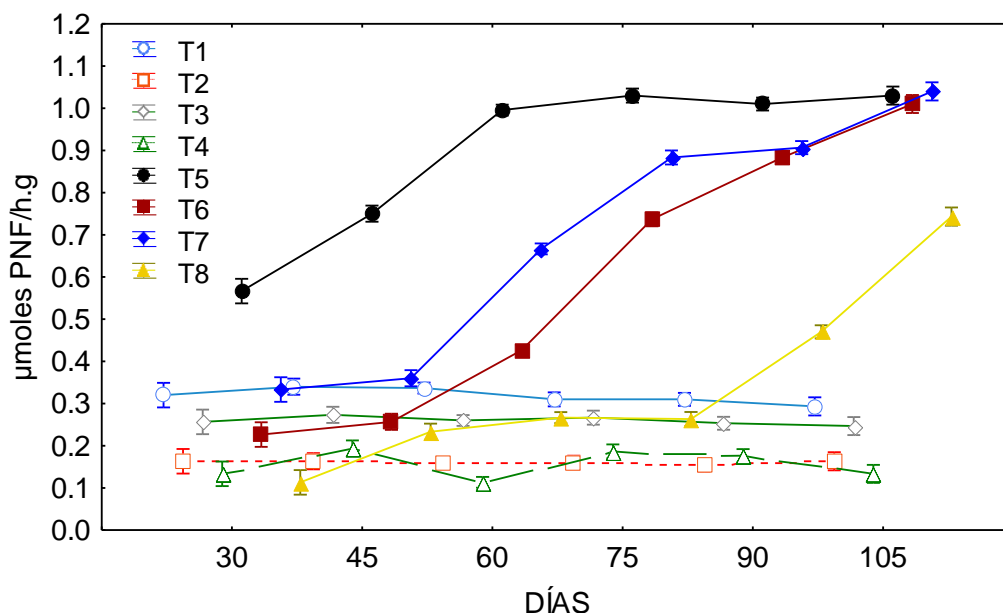


Figura 24: Actividad enzimática β -glucosidasa en el suelo del ensayo en macetas: T1: Control, T2: S + G 1.9%, T3: S + G 0.9%, T4: S + G 3.8%, T5: S + B, T6: S + B + G 1.9%, T7: S + B + G 0.9%, T8: S + B + G 3.8%.

8.2.8 Actividad enzimática fosfatasa en el suelo

La actividad fosfatasa en el suelo fue aumentando en todos los tratamientos a lo largo del experimento, sin embargo, las dosis aplicadas de glifosato causaron una disminución en esta actividad, en tratamientos con y sin biosólido (Fig. 25).

En los tratamientos sin biosólido, el T1 tuvo la mayor actividad con un promedio de 1.02 μ moles PNF/h. g, posteriormente el T2 y T3 quienes estadísticamente son iguales con un promedio de 0.67 μ moles PNF/h. g y por último el T4 con 0.59 μ moles PNF/h.g, es decir que la concentración mínima y media de glifosato (0.9 y 1.9%) disminuye un 34.3 % y la cantidad más alta (3.8%) disminuye hasta un 42.1% la actividad fosfatasa en el suelo.

En los tratamientos con biosólido existen diferencias significativas entre todos los tratamientos ($F(637.91) = 35.80, p < 0.05$), el T5 fue mayor al $T7 > T6 > T8$ con un promedio de 3.46, 2.33, 2.14 y 1.72 $\mu\text{moles PNF/h. g}$ respectivamente, esto indica una disminución de la actividad fosfatasa respecto al control de 32.6, 38.1 y 50.2 % a una concentración de 0.9, 1.9 y 3.8 % de glifosato respectivamente. La aplicación del biosólido estimuló la actividad enzimática fosfatasa ya que la concentración promedio de los tratamientos con biosólido a lo largo del experimento fue 3.2 veces mayor en comparación con los tratamientos sin biosólido.

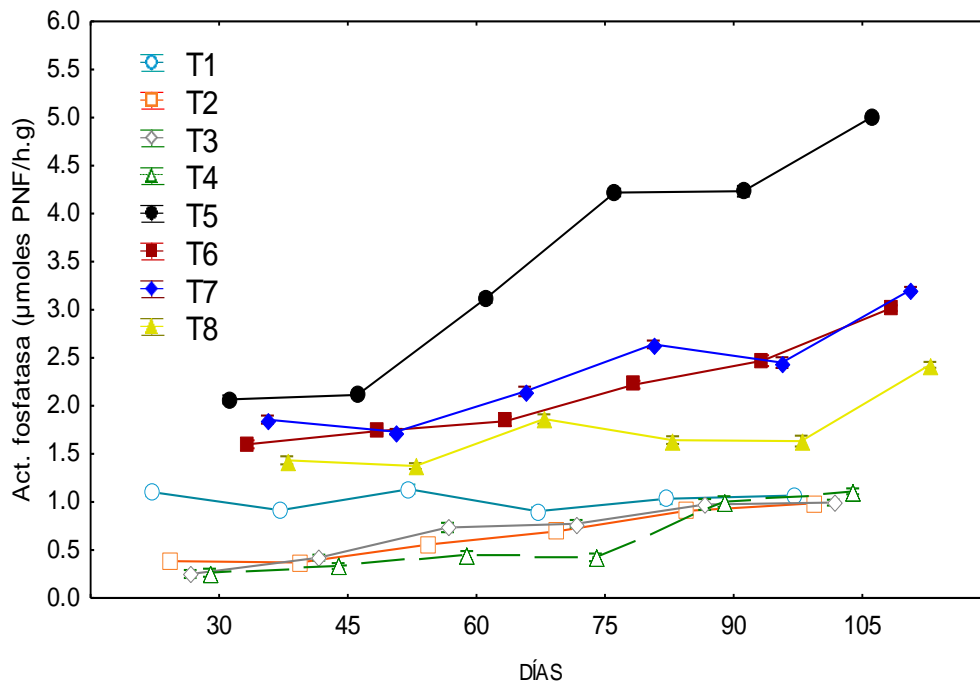


Figura 25: Actividad enzimática fosfatasa en el suelo del ensayo en macetas: T1: Control, T2: S + G 1.9%, T3: S + G 0.9%, T4: S + G 3.8%, T5: S + B, T6: S + B + G 1.9%, T7: S + B + G 0.9%, T8: S + B + G 3.8%.

8.3 Efecto del glifosato sobre la planta de jamaica.

8.3.1 Crecimiento de la planta

La altura de la planta de jamaica fue en promedio 1.3 veces mayor en los tratamientos con biosólido (T5 al T8) comparado con los tratamientos sin biosólido (T1 al T4). El T1 fue el de menor altura con un promedio (n=35) de 47.85 cm, el T2, T3 y T4 con un promedio de 56.3 cm, pero si existe una diferencia de 1.17 veces mayor respecto al control. Los tratamientos con biosólido no mostraron diferencia significativa entre ellos, su altura promedio estuvo en un intervalo de 70 a 75 cm, el T7 y T8 obtuvieron las plantas de mayor altura con 75 cm (Fig. 26).

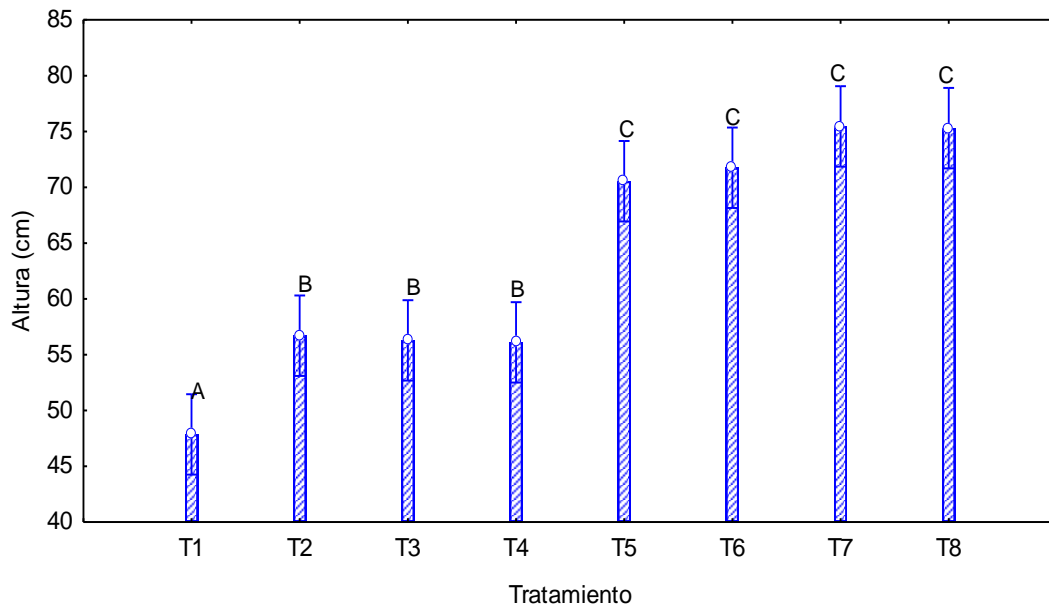


Figura 26: Altura promedio de la planta de jamaica durante el experimento: T1: Control, T2: S + G 1.9%, T3: S + G 0.9%, T4: S + G 3.8%, T5: S + B, T6: S + B + G 1.9%, T7: S + B + G 0.9%, T8: S + B + G 3.8%. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. $F(9.55) = 42.19, p < 0.05$.

8.3.2 Clorofila “a”, “b” y total

La concentración de clorofila “a” mostró diferencias entre tratamientos con y sin biosólido y glifosato ($F(18.6) = 7.11, p < 0.05$). En los tratamientos sin biosólido (T1 al T4) no mostró diferencias significativas al aplicar las concentraciones de glifosato con respecto al control, estos tratamientos tuvieron una concentración promedio de clorofila a de $20 \mu\text{g g}^{-1}$.

En los tratamientos con biosólido (T5 al T8) el análisis estadístico tampoco mostró diferencias significativas entre los tratamientos con glifosato respecto al control, estos tratamientos tuvieron una concentración promedio de clorofila a de $24 \mu\text{g g}^{-1}$. A pesar de que los controles sin glifosato (T1 y T5) no tuvieron diferencias significativas entre ellos, los tratamientos con biosólido tuvieron una concentración de clorofila a de 1.2 veces más en comparación con los tratamientos sin biosólido (cuadro 9).

La concentración de clorofila “b” fue afectada al aplicar la mayor cantidad de glifosato (3.8 %). En el T4 (sin biosólido) disminuyó un 23.5 % respecto al control y un 15.78 % en el T8 (con biosólido). Las otras concentraciones de glifosato (1.9 y 0.9 %) no mostraron diferencias significativas respecto al control. Los tratamientos sin biosólido tuvieron una concentración promedio de 16 y $45 \mu\text{g g}^{-1}$ en los tratamientos con biosólido. La concentración de clorofila b en los tratamientos con biosólido fue 2.8 veces mayor que en los tratamientos sin biosólido (cuadro 9) ($F(14.4) = 7.11, p < 0.05$).

La concentración de clorofila total no mostró diferencias significativas al aplicar las 3 dosis de glifosato respecto al control, pero si muestra diferencias al aplicar o no el biosólido, los tratamientos con biosólido (T5 al T8) tuvieron una concentración de 1.16 veces más con respecto a los tratamientos sin biosólido (T1 al T4) con una concentración promedio de clorofila total de 42 y $36 \mu\text{g}$ para los tratamientos sin biosólido (cuadro 7) ($F(14.2) = 7.11, p < 0.05$).

Cuadro 7: Concentración de clorofila “a”, “b” y total en hojas de jamaica

Tratamiento	Chl-a	Chl-b	Chl-total
T1	21 ± 5.9 ^{ab}	17 ± 8.9 ^a	39 ± 14 ^{ab}
T2	19 ± 7.1 ^a	16 ± 7.9 ^a	36 ± 14 ^a
T3	19 ± 5.7 ^a	16 ± 6.8 ^a	36 ± 11 ^a
T4	21 ± 4.4 ^a	13 ± 4.7 ^b	34 ± 7.5 ^a
T5	23 ± 6.6 ^{ab}	19 ± 9.5 ^c	42 ± 14 ^{ab}
T6	24 ± 9 ^b	20 ± 11 ^c	45 ± 19 ^b
T7	24 ± 7.6 ^b	20 ± 9.7 ^c	44 ± 16 ^b
T8	24 ± 3.5 ^b	16 ± 4.7 ^a	40 ± 6.7 ^b

Donde: T1: Control, T2: S + G 1.9%, T3: S + G 0.9%, T4: S + G 3.8%, T5: S + B, T6: S + B + G 1.9%, T7: S + B + G 0.9%, T8: S + B + G 3.8%. Las unidades son: $\mu\text{g g}^{-1}$
Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por cada clorofila ($p < 0.05$).

8.3.3 Antocianinas

Las antocianinas en las hojas de jamaica estuvieron presentes durante todo el tiempo del experimento. La concentración promedio de cianidina en los tratamientos sin biosólido (T1 al T4) fue de 14.12 mg mL^{-1} y no se encontraron diferencias significativas al aplicar el glifosato con respecto al control. En los tratamientos con biosólido, hay un aumento del 13.5 % (16.55 mg mL^{-1}) al aplicar 3.8 % de glifosato (T8) con respecto al control, el T5 al T7 no mostraron diferencias significativas entre ellos y obtuvieron una concentración promedio de 14.85 mg mL^{-1} . A pesar de que los controles no son diferentes estadísticamente, los tratamientos con biosólido presentaron una concentración 1.08 veces mayor que los tratamientos sin biosólido (cuadro 8).

Cuadro 8: Concentración de cianidina en hojas de jamaica.

Tratamiento/días	15	30	45	60	75	90	105	Ī
T1	9.12	17.84	17.84	16.79	14.36	16.24	10.18	14.62 ^{ab}
T2	11.20	13.95	16.14	15.49	13.67	15.36	10.96	13.82 ^a
T3	10.12	12.28	14.87	14.50	17.53	16.58	13.10	14.14 ^a
T4	12.32	12.72	14.21	15.27	16.38	13.77	12.73	13.92 ^a
T5	10.96	13.91	16.86	15.57	15.86	15.82	13.06	14.58 ^{ab}
T6	9.67	14.15	16.05	16.17	17.88	15.12	16.31	15.05 ^b
T7	8.83	13.37	15.97	16.56	19.36	13.88	16.58	14.94 ^b
T8	9.64	14.34	18.71	17.63	22.79	16.44	16.29	16.55 ^c

La concentración de cianidina está dada en mg mL^{-1} . Donde: T1: Control, T2: S + G 1.9%, T3: S + G 0.9%, T4: S + G 3.8%, T5: S + B, T6: S + B + G 1.9%, T7: S + B + G 0.9%, T8: S + B + G 3.8%. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. $F(8.38) = 42.67, p < 0.05$.

La concentración de delfinidina en las hojas de jamaica fue menor que la concentración de cianidina. Los tratamientos sin biosólido (T1 al T4) tuvieron una concentración promedio de delfinidina de 5.6 mg mL^{-1} y no se encontraron diferencias al aplicar las dosis de glifosato.

En los tratamientos con biosólido (T5 al T8), el T8 que tiene la más alta cantidad de glifosato aumentó 14.16 % la concentración de delfinidina respecto al control con un promedio de 6.61 mg mL^{-1} y para el T5 al T7 una concentración de 5.9 mg mL^{-1} . Estos tratamientos tuvieron una concentración de delfinidina 1.08 veces mayor que los tratamientos sin biosólido con un promedio de 6.08 mg mL^{-1} (cuadro 9).

El comportamiento de las cianidinas y delfinidinas en las hojas de jamaica fue semejante durante el experimento. El primer día de muestreo (día 15) hubo una concentración de 10.23 mg mL^{-1} de cianidina y 3.98 mg mL^{-1} de delfinidina, esta concentración fue aumentando hasta el día 75 donde se obtuvo la mayor concentración de ambas antocianinas, con valores de 17.23 y 6.82 mg mL^{-1} de cianidina y delfinidina respectivamente, posteriormente la concentración de antocianinas fue disminuyendo hasta el final del experimento.

Cuadro 9: Concentración de delphinidina en hojas de jamaica durante 105 días.

Tratamiento/días	15	30	45	60	75	90	105	\bar{X}
T1	3.46	7.12	7.12	6.61	5.82	6.37	4.04	5.79 ^{ab}
T2	4.32	5.68	6.48	6.19	5.42	6.02	4.35	5.50 ^a
T3	4.00	5.02	6.09	5.81	6.94	6.53	5.10	5.64 ^a
T4	4.78	5.03	5.79	6.08	6.41	5.39	5.02	5.50 ^a
T5	4.36	5.41	6.80	6.19	6.27	6.24	5.26	5.79 ^{ab}
T6	3.81	5.86	6.44	6.45	7.07	6.00	6.45	6.01 ^b
T7	3.35	5.17	6.47	6.67	7.68	5.52	6.59	5.92 ^b
T8	3.78	6.53	7.34	6.86	8.92	6.35	6.46	6.61 ^c

La concentración de delphinidina está dada en mg mL^{-1} . Donde: T1: Control, T2: S + G 1.9%, T3: S + G 0.9%, T4: S + G 3.8%, T5: S + B, T6: S + B + G 1.9%, T7: S + B + G 0.9%, T8: S + B + G 3.8%. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. $F(8.24) = 42.67$, $p < 0.05$.

Con respecto a las antocianinas en los cálices de jamaica, al igual que en las hojas se encontró una mayor concentración de cianidina que delphinidina con un promedio de 75.72 y 32 mg mL^{-1} respectivamente (Fig. 27), con diferencias significativas entre tratamientos, $F(12.8) = 7.64$, $p < 0.05$.

En los tratamientos sin biosólido (T1 al T4), la concentración de cianidina en los cálices de jamaica, al aplicar una concentración de glifosato de 3.8 % (T4) tuvo un aumento de 10.9 % con respecto al control, mientras que entre el T1, T2 y T3 tuvieron una concentración promedio de cianidina de 74.3 mg mL^{-1} .

En los tratamientos con biosólido (T5 al T8), el T6 y T8 quienes tienen una concentración de glifosato de 1.9 y 3.8% tuvieron una disminución de cianidina de 17.8% respecto al control, el T6 con una concentración de 0.9% de glifosato estuvo semejante al control con un promedio de 82.45 mg mL^{-1} de cianidina.

La concentración de delfinidina en los cálices de jamaica también se vio afectada al aplicar una alta concentración de glifosato (3.8%), el T4 (sin biosólido) tuvo un aumento de 11.6% y el T8 (con biosólido) tuvo una disminución de 15.5% de delfinidina respecto al control, la concentración media de glifosato (1.9%) en el tratamiento sin biosólido (T2) y con biosólido tuvieron una disminución de 20.6%; la concentración mínima de glifosato (0.9%) no mostró diferencias al ser aplicado al suelo con o sin biosólido.

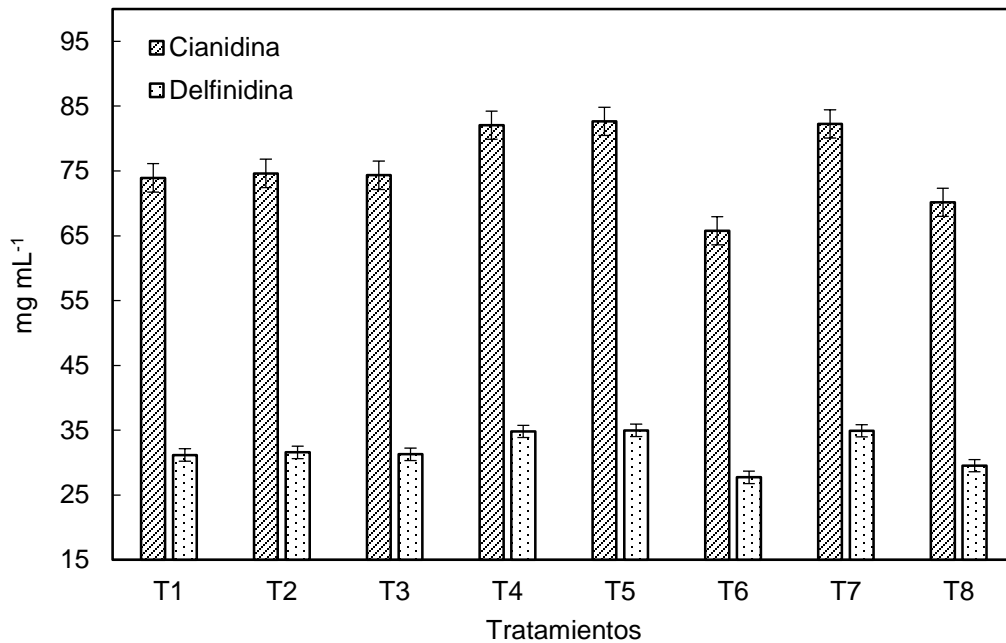


Figura 27: Concentración de cianidina y delfinidina en los cálices de jamaica: T1: Control, T2: S + G 1.9%, T3: S + G 0.9%, T4: S + G 3.8%, T5: S + B, T6: S + B + G 1.9%, T7: S + B + G 0.9%, T8: S + B + G 3.8%.

9 DISCUSION

9.1 Toxicidad del glifosato en semillas de jamaica y caoba

De acuerdo con los resultados del IG (cuadro 8), el glifosato presentó una toxicidad moderada a una concentración de 1 mg y severa a una concentración de 3 y 80 mg en las dos especies de semillas utilizadas (jamaica y caoba), esta toxicidad se ve reflejada principalmente en la inhibición de la raíz.

Los resultados anteriores, concuerdan con Lallana *et al.*, (2013) quienes evaluaron el porcentaje de germinación y el porcentaje del Índice de germinación en semillas de lechuga y trigo, utilizando dosis decrecientes entre 1.2 y 0.01 g ha⁻¹ para la lechuga y entre 12.15 y 1.2 g ha⁻¹ para el trigo, obtuvieron diferencias significativas entre el porcentaje del índice de germinación en distintas concentraciones de glifosato en ambas especies, mostrando su efecto negativo, sin embargo no encontraron diferencias en el porcentaje de germinación en ambas especies al utilizar distintas dosis del herbicida glifosato y el control, concluyendo que el glifosato tiene un efecto negativo sobre las plántulas cuando entra en contacto directo con la raíz.

Por otro lado, Babiker *et al.*, (2011) concluyeron que el uso del glifosato incrementa la susceptibilidad de la planta a contraer enfermedades, así como desequilibrios biológicos y fisiológicos, esto debido al modo de acción del glifosato que impide la síntesis de aminoácidos aromáticos y por lo tanto de proteínas que necesita la planta para crecer; los porcentajes del IG obtenidos en este trabajo mostraron efectos fisiológicos negativos en semillas de caoba y jamaica al estar en contacto directo con el glifosato ya que se inhibió el crecimiento radicular y del epicótilo.

Las semillas de caoba fueron más sensibles al efecto del glifosato ya que la presencia del herbicida inhibió el crecimiento de la raíz desde el día uno de aplicación a una concentración de 80 mg kg⁻¹, debido a que las plantas cultivadas o domesticadas han ido cambiando su metabolismo adaptándose a las condiciones actuales del cultivo, por lo cual son menos susceptibles a la contaminación en comparación a las plantas silvestres o nativas (Sharonova y Breus., 2012).

9.2 Efecto en la actividad microbiana

9.2.1 Respiración microbiana

Los resultados en la incubación del suelo mostraron que la aplicación de biosólido y glifosato estimularon la respiración microbiana (Fig. 6 al 8). Estos resultados concuerdan con Nguyen *et al.*, (2018) quienes investigaron el efecto del glifosato (0 a 79 mg kg⁻¹) en forma comercial y como ingrediente activo sobre la respiración microbiana en tres suelos agrícolas, como resultado tuvieron un aumento en la respiración microbiana conforme aumentaron la cantidad de glifosato, y a su vez, concluyeron que las características del suelo, la forma del herbicida y la concentración son factores dominantes sobre la actividad microbiana en el suelo.

Souza *et al.*, (1999) indicaron que un aumento de dióxido de carbono respecto al control está relacionado con la degradación del glifosato ya que este es un producto final de la degradación del herbicida, lo que indica que los microorganismos presentes en el suelo, son capaces de tolerar el glifosato y usarlo como fuente de nutriente (Allegrini *et al.*, 2015) en forma de C, N y P (Kryuchkova *et al.*, 2014).

9.2.2 Amonio en el suelo

Durante la incubación del suelo (Fig. 9 al 11), la producción de amonio fue estimulada con la aplicación del herbicida a una alta concentración (80 mg kg⁻¹) en tratamientos con (T8) y sin biosólido (T4), sin embargo, el T8 fue mayor.

El ensayo en macetas (Fig. 12) presentó en los tratamientos con glifosato 1.24 veces más producción amonio en comparación al control, sin embargo, en este caso la cantidad más alta de glifosato (3.8% v/v) no presentó una acumulación de amonio como el experimento de la incubación, ya que la ausencia de cobertura vegetal hace que las condiciones de humedad y temperatura sean variables con respecto a los suelos con vegetación, lo que interviene en el establecimiento de microorganismos que promueven la descomposición de la materia orgánica y facilita la lixiviación o emisión de compuestos nitrogenados a la atmósfera, mientras que la vegetación adsorbe el nitrógeno como nutriente (Arias y Sánchez 2014).

Allegrini *et al.*, 2017 señalaron que el glifosato causa un impacto negativo en las bacterias oxidantes de amonio en el suelo, disminuye su biomasa o provoca cambios fisiológicos y estructurales, dando como resultado la inhibición de la nitrificación (Muñoz-Leoz *et al.*, 2011).

Sin embargo, la acumulación del amonio en el suelo de ambos experimentos podría deberse a la degradación del herbicida (Duke, 2011) y al uso combinado del glifosato con una fuente de nitrógeno como el biosólido, que comúnmente son usados para fertilizar y proteger de maleza los cultivos agrícolas ya que aumenta la concentración de amonio y nitratos que puede ser aprovechado por las plantas, afectando positivamente la concentración de clorofila, amonio en el suelo y la planta, la cantidad de aminoácidos y biomasa (Nivelle *et al.*, 2018).

9.2.3 Nitritos en el suelo

De acuerdo con los resultados obtenidos en la incubación del suelo con glifosato (Fig. 13 y 14), la concentración de nitritos no mostró diferencias estadísticamente significativas al utilizar el biosólido y al utilizar 1 y 3 mg kg⁻¹ de glifosato, pero si existe diferencia al utilizar una concentración alta (80 mg kg⁻¹) de glifosato ya que aumentó 4.6 veces más la concentración de nitritos en comparación al control.

La alta concentración de nitritos en el T4 y T8 (15.67 mg kg^{-1}) concuerda con los valores altos de amonio (8.1 mg kg^{-1}) obtenidos en esos mismos tratamientos, lo cual indica que hay amonio disponible para llevar a cabo la nitrificación (Grandett *et al.*, 2015), aunque hay estudios que demuestran el efecto negativo del glifosato sobre bacterias oxidantes de amonio como el de Zabaloy *et al.*, (2017), nuestros resultados indican lo contrario.

La concentración de nitritos en el ensayo en macetas (Fig. 15), los tratamientos con biosólido y la concentración media (1.9 %) y alta (3.8 %) de glifosato que corresponden al T6 y T8 respectivamente tuvieron la mayor concentración de nitritos (3.8 mg kg^{-1}), estos valores se encuentran dentro del límite (10 mg kg^{-1}) que la literatura menciona como tóxico para las plantas (Carreño *et al.*, 1999), en comparación al suelo incubado, en donde la concentración más alta de glifosato provocó un aumento 4 veces mayor de nitritos en el suelo con y sin biosólido.

9.2.4 Nitratos en el suelo

El efecto negativo del glifosato sobre la nitrificación en el suelo ha sido documentado desde hace varios años, Mendoza *et al.*, (1999), en ensayos *in vitro* evaluaron el efecto tóxico del glifosato y el paraquat sobre el proceso de nitrificación en un suelo franco-arenoso, observaron una reducción de la nitrificación medida por la cantidad de nitratos al aplicar altas concentraciones de los herbicidas en fórmula comercial (100 y 1000 mg kg^{-1}) concluyeron que posiblemente sea por la reducción de poblaciones microbianas sensibles del uso del glifosato. Al igual que los resultados obtenidos en este trabajo la aplicación de 80 mg kg^{-1} de glifosato disminuyó un 70% la cantidad de nitratos en tratamientos con y sin biosólido.

Otro estudio mostró que la concentración de nitratos o el potencial de nitrificación medida por la concentración de nitratos se ve mejorada cuando un suelo es fertilizado aún a pesar de la presencia del herbicida a dosis recomendadas como lo indican (Zabaloy *et al.*, 2017) quienes obtuvieron mayor concentración de nitratos (4 veces más) en suelos fertilizados con sulfato de amonio y la aplicación de glifosato en comparación al control.

Al igual que Zabaloy *et al.*, (2017) los resultados de los tratamientos con biosólido no tuvieron mostraron efectos sobre la cantidad de nitratos al aplicar glifosato a dosis recomendadas (1 y 3 mg kg⁻¹). Sin embargo, se deben considerar las características del suelo, según Rose *et al.*, (2016) el proceso de nitrificación en suelos con baja materia orgánica es más susceptible al efecto del glifosato causando la inhibición o alteración del ciclo del nitrógeno (Pereg *et al.*, 2018).

La fertilización nitrogenada inorgánica (en este caso el biosólido), provee el suelo con concentraciones relativamente altas de nitrato y amoníaco de vida corta, la descomposición de la materia orgánica suministra nitrógeno y carbono gradualmente al suelo, disponibles para el mantenimiento de las bacterias diazotróficas, desnitrificantes y nitrificantes, y a su vez mejora otras propiedades del suelo, como la capacidad de retención del agua, la composición microbiana y estructura del suelo, (García-Orenes, *et al.*, 2016).

9.2.5 Actividad enzimática (DAFt).

La actividad microbiana en la incubación del suelo (Fig. 18 al 20), medida por la tasa neta de liberación de fluoresceína (DAFt) en los tratamientos con biosólido fue 1.3 veces mayor que en los tratamientos sin biosólido debido a la adición de biomasa microbiana y materia orgánica presente en el biosólido lo cual puede influenciar la diversidad microbiana, la humedad y la viabilidad de nutrientes en el suelo incrementado la materia orgánica, mejorando la porosidad y la actividad biológica (Zhen *et al.*, 2014).

La concentración mínima y media de glifosato (1 y 3 mg kg^{-1}) no causó efectos significativos sobre la actividad enzimática en el suelo, pero a una concentración elevada (80 mg kg^{-1}) mostró un incremento en tratamientos sin biosólido. Los tratamientos con biosólido tuvieron una estimulación de la actividad a concentraciones de 3 y 80 mg kg^{-1} de glifosato y no hubo efecto al aplicar 1 mg kg^{-1} del herbicida, esto concuerda con la literatura que indica que la actividad enzimática de los microorganismos del suelo es poco sensible al glifosato a dosis recomendadas (Nguyen *et al.*, 2018) y causa una estimulación con dosis entre 2 y 200 mg kg^{-1} (Sannino y Gianfreda 2001).

La cuantificación de DAFt es una medición de 3 grupos diferentes de enzimas: proteasas, lipasas y esterases (Godoy *et al.*, 2014), es este caso la estimulación de actividad enzimática podría venir de las enzimas proteasas que están involucradas en el ciclo del nitrógeno con la producción de amonio, lo que explica los altos valores de amonio en los mismos tratamientos con la más alta actividad enzimática obtenidos en este experimento.

En el ensayo en macetas, el glifosato no causó algún efecto sobre la actividad enzimática en los tratamientos con biosólido, sin embargo en los tratamientos sin biosólido causó una estimulación desde el día 15 de muestreo al día 45 y posteriormente disminuyó a concentraciones semejantes a las iniciales (Fig. 21 y 22), este comportamiento ya sido reportado por Araújo *et al.*, (2003) quienes demostraron la estimulación sobre la hidrólisis de diacetato de fluoresceína en el suelo a corto plazo (2 días) indicativo de la metabolización del glifosato y la disminución a lo largo del tiempo (32 días) podría deberse a la progresiva reducción del carbono disponible proveniente del glifosato (Gómez *et al.*, 2009).

En condiciones de campo, algunos estudios han demostrado el efecto nulo o pequeño del glifosato sobre la actividad microbiana (Ferreira *et al.*, 2006), mientras que otros han encontrado efectos considerables, en el incremento temporal de algunas poblaciones bacterianas con su concomitante aumento de actividad enzimática (Wardle y Parkinson., 1990).

9.2.6 Actividad enzimática deshidrogenasa en el suelo

En este estudio el glifosato inhibió la actividad deshidrogenasa en el suelo en medida a la concentración utilizada (Fig. 23), esto concuerda con Gómez *et al.*, (2009), quienes tuvieron resultados similares al evaluar el efecto del glifosato sobre la biomasa microbiana y el cociente metabólico del suelo, utilizaron la actividad deshidrogenasa para medir la actividad microbiana general del suelo, sus resultados concluyeron que dosis altas de glifosato (mayor a 2 L/Ha) causan una reducción de esta actividad enzimática, mientras que a dosis recomendadas no tienen ningún efecto (Zabaloy *et al.*, 2017).

Las enzimas deshidrogenasas catalizan las reacciones de óxido-reducción que son claves en el metabolismo energético de la célula, (Shaw y Burns, 2005), por lo que el efecto negativo del glifosato sobre esta actividad se relaciona directamente con el modo de acción del herbicida que impide la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en la que intervienen reacciones de óxido-reducción.

Por otro lado, los resultados de la actividad deshidrogenasa en este trabajo fueron mayor al utilizar el biosólido, posiblemente por la menor competición de compuestos orgánicos que los microorganismos del suelo utilizan de nutrientes, lo cual lleva a un favorable crecimiento de comunidades bacterianas (Zhang *et al.*, 2009), lo cual ayuda a mitigar los efectos de los plaguicidas en las comunidades microbianas no blanco en el suelo (Muñoz-Leoz *et al.*, 2011).

9.2.7 Actividad enzimática β -glucosidasa en el suelo

La aplicación del glifosato tuvo un efecto negativo sobre la actividad β -glucosidasa en el suelo, sin embargo, fue aumentando a lo largo del experimento (Fig. 24).

Nguyen *et al.*, (2018) mencionado anteriormente, además de evaluar el efecto del glifosato sobre la respiración microbiana, también lo evaluó a nivel enzimático, teniendo como resultado un aumento en la actividad β -glucosidasa al aplicar 2.9 mg kg^{-1} de glifosato en un suelo tipo cromosol. En otro estudio realizado por Nakatani *et al.*, (2014), donde evaluaron los cambios provocados en seis cultivos de soya transgénica mediante el uso de glifosato, encontraron que la actividad β -glucosidasa y fosfatasa ácida se redujeron al momento de la aplicación del herbicida, aunque también concluyeron que el efecto podría deberse a otras condiciones como: El tipo de suelo, temporada de cultivo, etc.

En ambos estudios la reducción de la actividad enzimática β -glucosidasa indica una alteración en el ciclo de C, ya que juega un papel muy importante en el suelo para liberar importantes fuentes de energía (carbohidratos) a los microorganismos presentes (Bandick y Dick, 1999), lo que explicaría el aumento de esta actividad en los tratamientos con biosólido y su aumento a lo largo del experimento (de 0.38 a 0.63 PNF/h.g) por la degradación de la materia orgánica y residuos vegetales provenientes de la planta de jamaica que entran en el ciclo del carbono.

9.2.8 Actividad enzimática fosfatasa en el suelo

La actividad fosfatasa en el suelo también fue inhibida con la aplicación del glifosato al inicio del experimento pero fue aumentando a lo largo del tiempo en todos los tratamientos, al finalizar, los tratamientos sin biosólido y glifosato estuvieron semejantes al control ($1.04 \mu\text{moles PNF/h.g}$), en los tratamientos con biosólido no ocurrió lo mismo, es decir que al final del experimento los tratamientos con biosólido y glifosato no igualaron al control, sin embargo, estos tuvieron una actividad 3.2 veces mayor que los tratamientos sin biosólido (Fig. 25).

La disminución significativa de la actividad fosfatasa en el suelo con la aplicación del glifosato indica una menor disponibilidad de fósforo para ser absorbido por las plantas, Zobiolo *et al.*, (2010) atribuyen este mecanismo al fuerte efecto quelante del glifosato en el suelo, lo que resulta en la inmovilización de nutrientes que a su vez afecta la función de la comunidad microbiana en el ciclo de nutrientes y Tejada en el 2006 concluye que la escasez de oxígeno en el suelo producido por la oxidación del glioxilato uno producto de la degradación del glifosato podría ser el responsable de la disminución de las actividades intracelulares (deshidrogenasa) y extracelulares (ureasa, β -glucosidasa, fosfatasa y arilsulfatasa), ya que la degradación del ácido glioxílico requiere de procesos de oxidación, por lo que se requiere oxígeno para llevar a cabo, produciendo CO_2 y NH_4^+ .

Sin embargo, Cherni *et al.*, (2015) demostraron que la aplicación de glifosato a dosis recomendadas no tiene efecto significativo en la actividad fosfatasa del suelo, la mayoría de las diferencias observadas fue al adicionar glifosato a tasas elevadas ($>10 \text{ mg kg}^{-1}$), en comparación a este trabajo se obtuvieron diferencias significativas al aplicar 1, 3 y 80 mg kg^{-1} de glifosato en tratamientos con y sin biosólido.

9.3 Efecto del glifosato sobre la planta de jamaica

9.3.1 Crecimiento de la planta

La aplicación del biosólido promovió el crecimiento de la planta de jamaica, (Fig. 26) ya que contiene micro y macronutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio) que la planta aprovecha para su crecimiento (Rigby *et al.*, 2016).

Los resultados concuerdan con Dad, *et al.*, (2019) quienes evaluaron el uso del biosólido, utilizando 4 dosis (0, 3.33, 6.66 y 9.99 tons/ha) para mejorar el crecimiento y rendimiento de un cultivo de trigo, tuvieron como resultado un aumento del 26.61, 40.13 y 54.8 % al utilizar 3.3, 6.66 y 9.99 tons/ha de biosólido respectivamente en la altura de la planta, también hubo un aumento en el diámetro del tallo de la planta y en rendimiento en peso seco del trigo en comparación al control, estos valores fueron semejantes al utilizar un

fertilizante inorgánico, concluyendo que el biosólido puede ser utilizado para reemplazar los fertilizantes químicos en la agricultura.

9.3.2 Clorofila “a”, “b” y total

La reducción de clorofila es probablemente por el daño directo del glifosato al cloroplasto o por la quelatinización de cationes como Mg^{2+} y Mn^{2+} , requeridos para la formación de clorofila y para la fotosíntesis (Reddy *et al.*, 2004), los datos reportados en este trabajo no muestran una reducción de clorofila “a”, pero sí, en la concentración de clorofila “b” a altas concentraciones de glifosato, cabe señalar que las dosis aplicadas son las recomendadas en el producto comercial utilizado (2, 1 y 4 L de glifosato en 100 L de agua por hectárea), Yao *et al.*, (2012) señalan que, la concentración de clorofila en las plantas se ve reducida por la presencia del glifosato, pero la magnitud depende de la dosis y tiempo de aplicación.

Gomes, *et al.*, (2016) observaron que el glifosato y su principal metabolito (AMPA) causan estrés oxidativo en las plantas que desencadena diferentes mecanismos que causan la disminución de clorofila en las hojas, y aunque no se conoce exactamente como estas sustancias interfieren, el glifosato provoca la degradación de clorofila mientras que AMPA inhibe la biosíntesis de esta.

9.3.3 Antocianinas

La producción de antocianinas (cianidina y delfinidina) en las hojas de jamaica (Cuadro 10 y 11), fue mayor al aplicar el biosólido con la cantidad más alta de glifosato (3.8%) ya que tuvo un aumento del 13.5 y 14.1 % para cianidina y delfinidina respectivamente. En el caso del cáliz (Fig. 27), en los tratamientos sin biosólido y la concentración más alta de glifosato (3.8%) estimuló un 10.9 y 11.6% la producción de antocianinas (cianidina y delfinidina respectivamente), mientras que en los tratamientos con biosólido disminuyó con esta misma concentración (17.8 y 15.5 % respectivamente).

La concentración más alta utilizada del herbicida (3.8%), en el tratamiento sin biosólido (T4) tuvo una mayor producción de antocianinas en los cálices que en las hojas de jamaica, debido probablemente a la translocación de las antocianinas a las partes de la planta de mayor demanda como un mecanismo de defensa ante el estrés producido por el glifosato en plantas no objetivo (Soares *et al.*, 2019). En cambio, el tratamiento con biosólido y 3.8 % de glifosato (T8) tuvo una mayor producción de antocianinas en las hojas que en el cáliz.

La deficiencia de nitrógeno inorgánico en los tratamientos sin biosólido (amonio y nitratos) también puede fomentar la síntesis y acumulación de antocianinas en las variedades de jamaica china y reyna (Dios-López *et al.*, 2011), ya que el amonio está involucrado con el metabolismo secundario de las plantas y los nitratos actúan sobre la limitación del desarrollo celular, por lo tanto el amonio se convierte en un factor limitante, deteniendo las rutas metabólicas y dirigiéndose hacia la producción de antocianinas como un mecanismo de defensa (Konczak-Islam *et al.*, 2001).

10 CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados y los resultados, el biosólido sirvió de atenuador del efecto toxico del glifosato en los microorganismos del suelo, estimuló la actividad enzimática, respiración microbiana y el proceso de nitrificación en el suelo.

El glifosato presentó una toxicidad moderada y severa en el índice de germinación en semillas de caoba y jamaica, afectando principalmente el crecimiento radicular.

En condiciones de laboratorio el glifosato promovió la respiración microbiana, la actividad enzimática del suelo, amonio y nitritos, pero causó una disminución en la cantidad de nitratos en concentraciones elevadas, lo cual causó un problema en el proceso de nitrificación.

La aplicación del biosólido al suelo in vitro aumentó la concentración de nitratos y la actividad enzimática en el suelo ayudando a mitigar el efecto negativo del glifosato sobre el proceso de nitrificación.

En el ensayo en macetas el biosólido estimuló la actividad enzimática de los microorganismos del suelo ayudando a mitigar los efectos del glifosato sobre la actividad enzimática edáfica.

Las características físico-químicas y microbiológicas del biosólido mejoraron la estructura del suelo y fue una fuente de nutrientes que promovió el crecimiento de la planta de jamaica.

11 RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados se plantean las siguientes recomendaciones para continuar generando información sobre el tema abordado en este trabajo:

- Utilizar dosis de glifosato crecientes que permitan conocer las dosis letales mínimas y máximas del herbicida sobre el índice de germinación en semillas.
- A nivel laboratorio también se recomienda hacer análisis enzimáticos para conocer el efecto del glifosato sobre los microorganismos del suelo.
- Realizar pruebas moleculares para conocer la diversidad de microorganismos presentes en el suelo y saber cuáles afecta el glifosato.
- Realizar ensayos en invernadero aplicando el biosólido con otros plaguicidas.
- Continuar aplicando el biosólido como fertilizante en otros cultivos.
- Realizar ensayos en macetas con jamaica a concentraciones de glifosato más elevadas a las utilizadas en este trabajo.
- Cuantificar el glifosato y su principal metabolito en el suelo y partes de la planta.
- Considerar las condiciones climáticas en ensayos a la intemperie.

12 BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, L. D., & Hernández, M. L. (2016). Biorremediación de suelos contaminados por organoclorados mediante la estimulación de microorganismos autóctonos, utilizando biosólidos. *Nexo Revista Científica*, 29(01), 22-28.
- Adam, G., & Duncan, H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7-8), 943-951.
- Allegrini, M., Gomez, E. D. V., & Zabaloy, M. C. (2017). Repeated glyphosate exposure induces shifts in nitrifying communities and metabolism of phenylpropanoids. *Soil Biology and Biochemistry*, 105, 206-215.
- Allegrini, M., Zabaloy, M. C., & Gómez, E. D. V. (2015). Ecotoxicological assessment of soil microbial community tolerance to glyphosate. *Science of the Total Environment*, 533, 60-68.
- American Public Health Association (APHA), (1983). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 13th edn. Washington, DC, 874 pp.
- Arango, L., Buddrus-Schiemann, K., Opelt, K., Lueders, T., Haesler, F., Schmid, M., & Hartmann, A. (2014). Effects of glyphosate on the bacterial community associated with roots of transgenic Roundup Ready® soybean. *European journal of soil biology*, 63, 41-48.
- Araújo, A. D., Monteiro, R. T. R., & Abarkeli, R. B. (2003). Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, 52(5), 799-804.
- Arellano-Aguilar, O. & J. Rendón von Osten. 2016. *La Huella de los Plaguicidas en México*. Greenpeace. Cd. De México, México. 39 pp.
- Arias, N. M. M., & Sánchez-Yañez, J. M. (2014). Nitrificación en suelos tropicales, asunto de competencia microbiana: un modelo basado en la teoría de Lotka-Volterra. *Revista Ecosistemas*, 23(3), 98-104.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1.
- Babiker, E. M., Hulbert, S. H., Schroeder, K. L., & Paulitz, T. C. (2011). Optimum timing of preplant applications of glyphosate to manage *Rhizoctonia* root rot in barley. *Plant Disease*, 95(3), 304-310.
- Bandick, A. K., & Dick, R. P. (1999). Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(11), 1471-1479.
- Benbrook, C.M., (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Science Europe*, 28 (1), 3.

Bergström, L., Börjesson, E., & Stenström, J. (2011). Laboratory and lysimeter studies of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a sand and a clay soil. *Journal of Environmental Quality*, 40(1), 98-108.

Bonny, S. 2016. Genetically Modified Herbicide-Tolerant Crops, Weeds, and Herbicides: overview and impact. *Environmental Management*. 57(1): 31-48

Busse, M. D., Ratcliff, A. W., Shestak, C. J., & Powers, R. F. (2001). Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12-13), 1777-1789.

Carreño, J., Acosta, A., Munévar, R., & Cuéllar, M. (1999). Cuantificación de los nitritos del suelo en un cultivo de palma de aceite en los Llanos Orientales y su relación con la lluvia, la variabilidad espacial y la labranza con cincel. *Palmas (Colombia)*, 20(4), 11-17.

Cassigneul, A., Benoit, P., Bergheaud, V., Dumény, V., Etievant, V., Goubard & Alletto, L. (2016). Fate of glyphosate and degradates in cover crop residues and underlying soil: A laboratory study. *Science of the Total Environment*, 545, 582-590.

Camacho, A., & Mejia, D. (2017). The health consequences of aerial spraying illicit crops: The case of Colombia. *Journal of health economics*, 54, 147-160.

Chekan, J. R., Cogan, D. P., & Nair, S. K. (2016). Molecular basis for resistance against phosphonate antibiotics and herbicides. *MedChemComm.*, 7(1), 28-36.

Cheng H.H. (1990). Pesticides in the soil environments –An overview. En: *Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modelling*. (H. Cheng, Ed.). *Soil Science Society of America*, book series No. 2, Madison, WI, pp. 1–5.

Cherni, A. E., Trabelsi, D., Chebil, S., Barhoumi, F., Rodríguez-Llorente, I. D., & Zribi, K. (2015). Effect of glyphosate on enzymatic activities, Rhizobiaceae and total bacterial communities in an agricultural Tunisian soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(5), 145.

COFEPRIS. 2009. Catálogo de Plaguicidas. http://www.cofepris.gob.mx/wb/cfp/Catálogo_de_plaguicidas.

CONAGUA (2008). *Estadísticas del agua en México*. Actualizado al mes de agosto de 2009. Comisión Nacional del Agua. México, D.F.

CONAGUA (COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA), (2011). Agenda del agua 2030. p. 70.

Cuervo, J. L., & Fuentes, C. L. (2014). Mineralization and sorption of ¹⁴C-glyphosate in samples from three soil types collected in El Espinal, Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38(148), 287-297.

- Dad, K., Wahid, A., Khan, A. A., Anwar, A., Ali, M., Sarwar, N., & Ansari, M. J. (2019). Nutritional status of different biosolids and their impact on various growth parameters of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1423-1428.
- Dios-López, A. D., Montalvo-González, E., Andrade-González, I., & Gómez-Leyva, J. F. (2011). Inducción de antocianinas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) in vitro. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 17(2), 77-87.
- Duke, S. O. (2011). Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and-susceptible crops and weeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 5835-5841.
- Duncan, D. R., & Paxton, J. D. (1981). Trifluralin enhancement of Phytophthora root rot of soybean. *Plant Disease*, 65(5), 435-436.
- Durkin, P.R., 2011. Glyphosate: Human Health and Ecological Risk Assessment. Final Report Submitted to the USDA Forest Service, SERA TR-052-22-03b. Syracuse Environmental Research Associates, Inc., Manlius, New York, USA https://www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/pdfs/Glyphosate_SERA_TR-052-22-03b.pdf.
- Erban, T., Stehlik, M., Sopko, B., Markovic, M., Seifrtova, M., Halesova, T., & Kovaricek, P. (2018). The different behaviors of glyphosate and AMPA in compost-amended soil. *Chemosphere*, 207, 78-83.
- Eslava, P., Ramírez, W. & Rondón, I. (2007). Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: Impacto en peces nativos. *Instituto de Acuicultura de los Llanos. Instituto de Investigadores de la Orinoquia Colombiana*. Pp 34-43.
- FAO. (1996) Manejo de malezas para países en desarrollo (Estudio FAO producción y protección vegetal-120). Roma: Food & Agriculture Org. Vol. 120.
- Ferreira, E. A., Santos, J. B., & Silva, A. A. L. Vargas & Mr Reis. (2006). Glyphosate application for Italian ryegrass biotype control and impact on soil microbiota. *Planta Danina*, 24(3), 573-578.
- Fluegge, K., & Fluegge, K., (2016). Glyphosate use predicts healthcare utilization for ADHD in the healthcare cost and utilization project net (HCUPnet): a two-way fixed-effects analysis. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(4), 1489–1503.
- Fortes, C., Mastroeni, S., Segatto, M.M., Hohmann, C., Miligi, L., Bakos, L., & Bonamigo, R., (2016). Occupational exposure to pesticides with occupational sun exposure increases the risk for cutaneous melanoma. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 58(4), 370–375.

Funke, T., Healy-Fried, M.L., Han, H., Alberg, D.G., Bartlett, P.A., & Schönbrunn, E., (2007). Differential inhibition of class I and class II 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases by tetrahedral reaction intermediate analogues. *Biochemist* 46(46), 13344-13351.

García, O.N. (2006). Lodos residuales: Estabilización y manejo. *Caos conciencia*, 1(1), 51-58.

García, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B., & Masciandaro, G. (1993, September). The dehydrogenase activity of soil as an ecological marker in processes of perturbed system regeneration. In XI international symposium environmental biogeochemistry, Salamanca, Spain (Vol. 27, pp. 89-100).

García-Orenes, F., Roldán, A., Morugán-Coronado, A., Linares, C., Cerdà, A., & Caravaca, F. (2016). Organic fertilization in traditional mediterranean grapevine orchards mediates changes in soil microbial community structure and enhances soil fertility. *Land Degradation & Development*, 27(6), 1622-1628.

Godoy, R., Valenzuela, E., Guevara, G., Boy, J., Barrientos, M., & Matus, F. (2014). Biogeoquímica en bosques templados del sur de Chile. *Ecología Forestal. Editorial Universidad Austral de Chile, Valdivia*, 257-280.

González-Torralva, F., Cruz-Hipolito, H., Bastida, F., Mülleder, N., Smeda, R. J., & De Prado, R. (2010). Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4361-4366.

Gomes, M.P., Gingras Le Manac'h, S., Maccario, S., Labrecque, M., Lucotte, M., & Juneau, P., (2016). Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 130, 65-70.

Gómez, E., Ferreras, L., Lovotti, L., & Fernandez, E. (2009). Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. *European Journal of Soil Biology*, 45(2), 163-167.

Grandett, L., Reza, S. D. L. C. R., Jaraba, J., & Pardo, Y. (2015). Efecto de la actividad microbiana sobre la nitrificación en suelos cultivados con *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweicerd en Cereté, Córdoba. *Temas agrarios*, 20(2), 9-18.

Hong, V., & Wrolstad, R. E. (1990). Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 708-715.

USDA, Información y Servicios del United States Department of Agriculture. <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>. Manual de Agricultura N° 60. Acceso en mayo de 2010.

Jimarez-Ortiz, Dulce Rosario, Trujillo-Tapia, Ma. Nieves & Ramírez-Fuentes, Eustacio. (2018) Biosolid quality evaluated by its stability (FDA, CO₂) and maturity (GI). *ECORFAN Journal-Bolivia*, 5(9), 1-9.

Jenkinson, D. S., & Powlson, D. S. (1976). The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—V: A method for measuring soil biomass. *Soil biology and Biochemistry*, 8(3), 209-213.

Kidd, H. & James, D. R., Eds. The Agrochemicals Handbook, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, 1991 (As Updated).10-2

Konczak-Islam, I., Nakatani, M., Yoshinaga, M., & YAMAKAWA, O. (2001). Effect of ammonium ion and temperature on anthocyanin composition in sweet potato cell suspension culture. *Plant Biotechnology*, 18(2), 109-117.

Kończak M. & Oleszczuk P. (2018). Application of biochar to sewage sludge reduces toxicity and improve organisms growth in sewage sludge-amended soil in long term field experiment. *Science of the Total Environment*, 625, 8-15.

Kryuchkova, Y. V., Burygin, G. L., Gogoleva, N. E., Gogolev, Y. V., Chernyshova, M. P., Makarov, O. E., Fedorov, E.E & Turkovskaya, O. V. (2014). Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. *Microbiological Research*, 169(1), 99-105.

Lallana, M. D. C., Lallana, V. H., Billard, C. E., Foti, M. N., & Elizalde, J. H. (2013). Determinación de reducción del crecimiento radical (CE50) por una formulación de glifosato utilizando lechuga y trigo como especies bioindicadoras. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 45(1), 143-151.

Lévesque, C.A., & Rahe, J.E. (1992). Herbicide interactions with fungal root pathogens, with special reference to glyphosate. *Annual Review of Phytopathology*, 30(1), 579-602.

Li, J., Smeda, R.J., Sellers, B.A., & Johnson, W.G., (2005). Influence of formulation and glyphosate salt on absorption and translocation in three annual weeds. *Weed Science*. 53(2), 153–159.

Limón, M. (2013). *¿Los lodos de las plantas de tratamiento de aguas residuales, problema o recurso?* Tesis de Licenciatura, Universidad de Guadalajara, 13p.

Liu, C. M., McLean, P. A., Sookdeo, C. C., & Cannon, F. C. (1991). Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. *Applied Environmental Microbiology*, 57(6), 1799-1804.

Maqueda, C., Undabeytia, T., Villaverde, J., & Morillo, E., (2017). Behaviour of glyphosate in a reservoir and the surrounding agricultural soils. *Science of the Total Environmental*, 593, 787–795.

Marguí, E., Iglesias, M., Camps, F., Sala, L., & Hidalgo, M. (2016). Long-term use of biosolids as organic fertilizers in agricultural soils: potentially toxic elements occurrence and mobility. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 4454-4464.

Masciandaro, G., Ceccanti, B., & García, C. (1994). Anaerobic digestion of straw and piggyer wastewaters: II. Optimization of the process. *Agrochimica*, 38(3), 195-203.

Mensink, H., & Janssen, P., (1994). Environmental Health Criteria 159 - Glyphosate. National Institute of Public Health and Environmental Hygiene, Bilthoven, the Netherlands. Report for the International Programme on Chemical Safety, United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation. World Health Organization, Geneva, Switzerland

Mendoza, D. L., Peña, J., & Franco, A. (1999). Efecto del glifosato y paraquat sobre el proceso de nitrificación en un suelo del corregimiento de Río Frío (Magdalena, Colombia). *Revista colombiana de química*, 28(1), 87-95.

Moore, R.P. 1985. Handbook on Tetrazolium Testing. International Seed Testing Association. Michigan, EUA.

Morgano, M. T., Leibold, H., Richter, F., Stapf, D., & Seifert, H. (2018). Screw pyrolysis technology for sewage sludge treatment. *Waste Management*, 73, 487-495.

Muñoz-Leoz, B., Ruiz-Romera, E., Antigüedad, I., & Garbisu, C., (2011). Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(10), 2176-2183.

Nakatani, A. S., Fernandes, M. F., de Souza, R. A., da Silva, A. P., dos Reis-Junior, F. B., Mendes, I. C., & Hungria, M. (2014). Effects of the glyphosate-resistance gene and of herbicides applied to the soybean crop on soil microbial biomass and enzymes. *Field Crops Research*, 162, 20-29.

Nivelle, E., Verzeaux, J., Chabot, A., Roger, D., Chesnais, Q., Ameline, A., & Catterou, M. (2018). Effects of glyphosate application and nitrogen fertilization on the soil and the consequences on aboveground and belowground interactions. *Geoderma*, 311, 45-57.

NOM-004-SEMARNAT-2002. Norma Oficial Mexicana. Protección ambiental. Lodos y biosólidos. Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. *Diario Oficial de la Federación*.

NOM-052-ECOL-1993, Norma Oficial Mexicana que establece las características de los residuos peligrosos, el listado de los mismos y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente. *Diario Oficial de la Federación*, 2.

- Nguyen, D. B., Rose, M. T., Rose, T. J., & Van Zwieten, L. (2018). Effect of glyphosate and a commercial formulation on soil functionality assessed by substrate induced respiration and enzyme activity. *European Journal of Soil Biology*, 85, 64-72.
- Okada, E., Luis Costa, J., & Bedmar, F., (2016). Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage. *Geoderma* 263, 78–85.
- Oleszczuk, P., & Hollert, H. (2011). Comparison of sewage sludge toxicity to plants and invertebrates in three different soils. *Chemosphere*, 83(4), 502-509.
- Otaño, A., Correa, B., & Palomares, S. (2010). Water Pollutants Investigation Committee—First Report.
- Oviedo-Ocaña, E. R., Torres-Lozada, P., Marmolejo-Rebellon, L. F., Hoyos, L. V., Gonzales, S., Barrena, R., Komilis, D., & Sanchez, A. (2015). Stability and maturity of biowaste composts derived by small municipalities: Correlation among physical, chemical and biological indices. *Waste Management*, 44, 63-71.
- Pereg, L., Morugán-Coronado, A., McMillan, M., & García-Orenes, F. (2018). Restoration of nitrogen cycling community in grapevine soil by a decade of organic fertilization. *Soil and Tillage Research*, 179, 11-19.
- Potisek-Talavera, M. D. C., Figueroa-Viramontes, U., González-Cervantes, G., Jasso-Ibarra, R., & Orona-Castillo, I. (2010). Aplicación de biosólidos al suelo y su efecto sobre contenido de materia orgánica y nutrientes. *Terra Latinoamericana*, 28(4), 327-333.
- Priestman, M.A., Funke, T., Singh, I.M., Crupper, S.S., & Schönbrunn, E., (2005). 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. *FEBS Letters*, 579(3), 728–732.
- Reddy, K. N., Rimando, A. M., & Duke, S. O. (2004). Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5139-5143.
- Rendón-von Osten, J., & Dzul-Caamal, R., (2017). Glyphosate residues in groundwater, drinking water and urine of subsistence farmers from intensive agriculture localities: a survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 595.
- Rigby, H., Clarke, B. O., Pritchard, D. L., Meehan, B., Beshah, F., Smith, S. R., & Porter, N. A. (2016). A critical review of nitrogen mineralization in biosolids-amended soil, the associated fertilizer value for crop production and potential for emissions to the environment. *Science of the Total Environment*, 541, 1310-1338.

- Rodríguez-Gil, J.L., Prosser, R., Poirier, D., Lissemore, L., Thompson, D., Hanson, M., & Solomon, K.R., (2017). Aquatic hazard assessment of mon 0818, a commercial mixture of alkylamine ethoxylates commonly used in glyphosate-containing herbicide formulations. Part 1: species sensitivity distribution from laboratory acute exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(2), 501–511.
- Rose, M. T., Cavagnaro, T. R., Scanlan, C. A., Rose, T. J., Vancov, T., Kimber, S., Kennedy, I.R., Kookana, R.S & Van Zwieten, L. (2016). Impact of herbicides on soil biology and function. *In Advances in agronomy*, 136, 133-220. Academic Press.
- Salazar-López, N. J., & Madrid, M. L. A. (2011). Herbicida glifosato: usos, toxicidad y regulación. *BIOtecnia*, 13(2), 23-28.
- Sannino, F., & Gianfreda, L. (2001). Pesticide influence on soil enzymatic activities. *Chemosphere*, 45(4-5), 417-425.
- Schafer, J.R., Hallett, S.G., & Johnson, W.G., (2014). Rhizosphere microbial community dynamics in glyphosate-treated susceptible and resistant biotypes of giant ragweed (*Ambrosia trifida*). *Weed Science*. 62(2), 370–381.
- Schütte, G., Eckerstorfer, M., Rastelli, V., Reichenbecher, W., Restrepo-Vassalli, S., Ruohonen-Lehto, M., Wuest Saucy, A-G & Mertens, M. (2017). Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants. *Environmental Sciences Europe*, 29(1), 5: 1-12.
- SENER (2007). *Anuario estadístico de la industria petroquímica*. Secretaría de Energía. México, D.F. 289 pp.
- Shaner, D.L., Lindenmeijer, R.B., & Ostlie, M.H., (2012). What have mechanisms of resistance to glyphosate taught us? *Pest Management Science*. 68, 3–9.
- Sharonova, N., & Breus, I. (2012). Tolerance of cultivated and wild plants of different taxonomy to soil contamination by kerosene. *Science of the Total Environment*, 424, 121-129.
- Sharma, B., Sarkar, A., Singh, P., & Singh, R. P. (2017). Agricultural utilization of biosolids: A review on potential effects on soil and plant grown. *Waste Management*, 64, 117-132.
- Shaw, L. J., & Burns, R. G. (2005). Enzyme Activity Profiles and Soil Quality. *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*, 158-171
- Sidoli, P., Baran, N., & Angulo-Jaramillo, R., (2016). Glyphosate and AMPA adsorption in soils: laboratory experiments and pedotransfer rules. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(6), 5733–5742.
- Sikorski, Ł., Baciak, M., Bęś, A., & Adomas, B. (2019). The effects of glyphosate-based herbicide formulations on *Lemna minor*, a non-target species. *Aquatic Toxicology*, 209, 70-80.

- Singh, R. P., Sarkar, A., Sengupta, C., Singh, P., Miranda, R. L., Nunes, L. A. P. L., Araujo, A. S. F., & Melo, W. J. (2015). Effect of utilization of organic waste as agricultural amendment on soil microbial biomass. *Annual Research & Review in Biology*, 7(3), 155-162.
- Soares, C., Pereira, R., Spormann, S., & Fidalgo, F. (2019). Is soil contamination by a glyphosate commercial formulation truly harmless to non-target plants?—Evaluation of oxidative damage and antioxidant responses in tomato. *Environmental Pollution*, 247, 256-265.
- Souza, A. P., Ferreira, F.A., Silva, A.A., Cardoso, A.A., & Ruiz, H.A. (1999). Respiração microbiana do solo sob doses de glyphosate e de imazapyr. *Planta Daninha*, 17(3), 387-398.
- Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil biology and biochemistry*, 1(4), 301-307.
- Tejada, M. (2006). Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides. *Chemosphere*, 76, 365-373.
- Tian, Y.S., Yao, Q.H., Xing, X.J., Peng, R.H., Xu, J., & Xiong, A.S., (2015). Novel glyphosate-resistant aroA gene from *Paracoccus denitrificans* in transgenic *Arabidopsis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(5), 566–571
- USEPA (2010). Types of Pesticides. United States Environmental Protection Agency [en línea]. <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>. 12/03/2010.
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris Jr, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment*, 616, 255-268.
- Walker, E.R., & Oliver, L.R., (2008). Translocation and absorption of glyphosate in flowering sicklepod (*Senna obtusifolia*). *Weed Science*, 56(3), 338–343.
- Wang, S., Seiwert, B., Kästner, M., Miltner, A., Schäffer, A., Reemtsma, T., Yang, Q., & Nowak, K.M., (2016). (Bio) degradation of glyphosate in water-sediment microcosms - a stable isotope co-labeling approach. *Water Research*. 99, 91–100.
- Wardle, D. A., & Parkinson, D. (1990). Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant and soil*, 122(1), 21-28.
- Wilcox, Wf. (1996). Influence of dinitroaniline herbicides on growth, sporulation, and infectivity of four *Phytophthoras* pp. pathogenic to deciduous fruit trees. *Phytopathology*, 86(9), 906-913.

- Yao, H., Huang, Y., Hruska, Z., Thomson, S. J., & Reddy, K. N. (2012). Using vegetation index and modified derivative for early detection of soybean plant injury from glyphosate. *Computers and Electronics in Agriculture*, 89, 145-157.
- Yang, X., Wang, F., Bento, C.P.M., Xue, S., Gai, L., van Dam, R., Mol, H., Ritsema, C.J., & Geissen, V., (2015). Short-term transport of glyphosate with erosion in Chinese loess soil flume experiment. *Science of the Total Environment*, 512, 406–414.
- Zabaloy, M. C., Allegrini, M., Tebbe, D. A., Schuster, K., & Gomez, E. D. V. (2017). Nitrifying bacteria and archaea withstanding glyphosate in fertilized soil microcosms. *Applied Soil Ecology*, 117, 88-95.
- Zhang, B., Bai, Z., Hoefel, D., Tang, L., Wang, X., Li, B., & Zhuang, G. (2009). The impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere. *Science of the Total Environment*, 407(6), 1915-1922.
- Zhen, Z., Liu, H., Wang, N., Guo, L., Meng, J., Ding, N., & Jiang, G. (2014). Effects of manure compost application on soil microbial community diversity and soil microenvironments in a temperate cropland in China. *PloS one*, 9(10), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108555>
- Zobiolo, L. H. S., Kremer, R. J., Oliveira Jr, R. S., & Constantin, J. (2011). Glyphosate affects micro-organisms in rhizospheres of glyphosate-resistant soybeans. *Journal of Applied Microbiology*, 110(1), 118-127.
- Zobiolo, L. H. S., de Oliveira, R. S., Huber, D. M., Constantin, J., de Castro, C., de Oliveira, F. A., & de Oliveira, A. (2010). Glyphosate reduces shoot concentrations of mineral nutrients in glyphosate-resistant soybeans. *Plant and Soil*, 328(1-2), 57-69.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., & De Bertoli, M. (1981). Evaluating toxicity in immature compost. *Biocycle*. 22(2), 54–57.

13 ANEXOS

13.1 Anexo A: Características del biosólido y del suelo.

Características físicas, químicas y microbiológicas del biosólido en comparación a la NOM-004 (Jimarez-Ortiz, *et al.*, 2018).

Características	Biosólido	NOM-004
pH	5.2	NA
Conductividad eléctrica (dS m ⁻¹)	2.7	NA
Materia orgánica (%)	3.7	NA
Capacidad de retención del agua (mL g ⁻¹)	3.07	NA
Nitrógeno total (%)	2.05	NA
Carbono orgánico total (%)	2.2	NA
Carbono: Nitrógeno	1.07	NA
Densidad real (g cm ³)	0.4	NA
Densidad aparente (g cm ³)	0.02	NA
Espacio Poroso (%)	94.3	NA
Huevos de Helminto	0.0	< 1
Coliformes fecales (NMP)	2	< 1000
Cd	3.6	39-85
Pb	13.9	300-840
Ni	3.8	420
Zn	44.9	2800-7500
Ar	ND	41-75
Cr	ND	1200-3000

El lodo residual (proveniente del PTAR en Bahías de Huatulco) y el biosólido (producto final del proceso de compostaje). NA (no aplica). ND (no determinado). El valor de los metales pesados se expresa en mg kg⁻¹ en base seca.

Características fisicoquímicas del suelo de Santo Domingo de Morelos, Oax. (Jimarez-Ortiz *et al.*, 2018).

pH	CE (dS m ⁻¹)	% arcilla	% limo	% arena	% de humedad	% CRA	Densidad	%CO	%MO	%NT	C:N
7.7	0.02	9.6	14.2	78.2	1.1	40	2.1	0.38	0.66	0.1	3.5

CE: conductividad eléctrica, CRA: capacidad de retención de agua, CO: carbono orgánico, MO: materia orgánica, NT: nitrógeno total y C:N: carbono: nitrógeno

13.2 Anexo B: Técnicas analíticas utilizadas

Cuantificación de CO₂ por titulación

En un matraz de 125 mL se colocó 50 ml de agua destilada para posteriormente agregar 5 mL de NaOH correspondiente al tratamiento a evaluar, enseguida se le adicionaron 3 gotas de fenoftaleina, esta mezcla se tituló con HCl 2N hasta que se observó un vire y se terminó de titular con HCl 0.1 N hasta un vire transparente, luego se le adicionaron 5 gotas de anaranjado de metilo y por último se tituló con HCl 0.1N hasta un vire color naranja tenue. El total de CO₂ producido se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación

$$CO_2(mg\ g^{-1}) = (M - B) \left(\frac{N_{HCl} * Peq_{CO_2}}{P_{Suelo}} \right)$$

Donde:

B: Volumen consumido de ácido en el blanco (mL)

M: Volumen consumido de ácido en la muestra (mL)

N_{HCl}: normalidad del HCl (0.1 N)

Peq CO₂: Peso equivalente de CO₂ (22)

P_{suelo}: Peso húmedo del suelo

Extracto de suelo

La extracción se realizó con K₂SO₄ a 0.5M. Se pesaron 20 g de muestra de cada tratamiento por triplicado y se le adicionó 80 mL de K₂SO₄, se agitaron durante 1 hora y por último se filtraron utilizando papel filtro. Los extractos obtenidos se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis.

Cuantificación de amonio

Se tomó una alícuota de 0.1 mL del extracto de suelo en un tubo de ensaye, se le adicionó 5 mL de reactivo de color y mezcló utilizando un vortex, se dejó reposar durante 15 min y después se le adicionó 5 mL de una solución alcalina y se mezcló nuevamente, se dejó reposar durante una hora y se midió la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro, el blanco se realizó con agua destilada.

Cuantificación de nitritos

Se tomó una alícuota de 5 mL del extracto de suelo en tubos de ensaye, se le agregó 10 mL de agua destilada, 1 mL de naftilamina, 1 mL de EDTA y 1 mL de ácido sulfanílico, mezclando en cada adición, se dejó reposar por 10 min. Y enseguida se le agregó 1 mL de naftilamina y 1 mL de acetato de sodio, se mezcló perfectamente con un vortex y después de 30 min se midió la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro.

Cuantificación de nitratos

Se colocaron 5 mL del extracto de suelo en frascos de vidrio con 50 mL de capacidad y se dejaron secar en la estufa hasta la formación de cristales, posteriormente se les agregó 1 mL de ácido fenildisulfónico y se mezcló perfectamente, luego se diluyó con 10 mL de agua destilada y enseguida se les agregó 5 mL de una solución de KOH 12N, se aforó a 25 mL y se transfirió a tubos de ensaye, por último, se midió la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro.

Cuantificación de la actividad enzimática mediante la hidrólisis de diacetato de fluoresceína (DAFt)

Se pesaron 2 g de cada muestra de suelo y se colocaron en tubos falcón de 50 mL, se le adicionaron 20 mL de buffer de fosfatos 60 mM a pH 7.6 y se agitaron hasta obtener una muestra homogénea, posteriormente se les adicionó 0.50 mL de solución de DAF (20 mg DAF substrato Sigma en 10 mL de acetona), los tubos se agitaron nuevamente y después se colocaron en baño maría a 37°C por 30 min. A continuación de les adicionaron 2 mL de acetona (grado reactivo) y se centrifugaron a 600 rpm por 10 min, enseguida se filtró utilizando papel filtro y finalmente se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro, se realiza un blanco sin suelo, se utilizó la siguiente ecuación para la concentración neta liberada de fluoresceína

$$DAFt = \frac{CNF * Vfs}{t * Ms}$$

DAFt: Tasa neta de liberación de fluoresceína (mg kg⁻¹h⁻¹)

CNF: Concentración neta de fluoresceína

Vfs: Volumen final (L)

t: Periodo de incubación (horas)

Ms: Peso seco del suelo (kg)

Cuantificación de la actividad deshidrogenasa en el suelo

Se pesó 1 g de suelo de cada tratamiento y se colocaron en tubos de ensaye, se les adicionó 0.4 mL de agua destilada y 0.2 mL de N,N-metilformamida al 0.4% y al control solo se le agregó 0.6 mL de agua destilada, se incubaron durante 20 horas en obscuridad a 20°C, posteriormente se les agregó 10 mL de metanol (grado reactivo), se agitaron en un vortex por 2 min y finalmente se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro.

Cuantificación de la actividad β-glucosidasa en el suelo

Se pesó 0.5 g de muestra de suelo en tubos falcón de 15 mL, se les agregó 2 mL de un tampón universal modificado (MUB-HCl 0.1M pH 6), 1 mL de agua destilada y 0.5 mL de p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido, se agitaron y se incubaron a 37°C durante 1 hora, posteriormente se colocaron en hielo por 15 min, después se les agregó 0.5 mL CaCl₂ 0.5M y 2 mL de una solución de trishidroximetilaminometano (THAM 0.1M pH 12), por último las muestras se centrifugaron durante 15 min y se midió la absorbancia a 400 nm.

Cuantificación de la actividad fosfatasa en el suelo

Se pesaron 0.5 g de suelo de cada muestra en tubos falcón de 15 mL, se les agregó 2 mL de MUB pH 11 y 0.5 mL de p-nitrofenilfosfato (saldisódica 6H₂O) 0.025M, se mezclaron perfectamente y se colocaron en baño maría con agitación durante 1 hora a 37°C, después de la hora se colocaron en hielo durante 15 min, y posteriormente se les agregó 0.5 mL de CaCl₂ 0.5M y 2 mL de NaOH 0.5M para centrifugarse durante 5 min, finalmente se midió la absorbancia a 400 nm en un espectrofotómetro.

Se utilizó la siguiente ecuación para calcular la actividad enzimática fosfatasa, β-glucosidasa y deshidrogenasa.

$$\left(\frac{\mu\text{moles PNF liberado}}{h. g} \right) = \frac{M \cdot fd}{Pm \cdot Ps}$$

M= cantidad de p-nitrofenol (PNF) de la muestra en µg.

Pm= peso molecular del p-nitrofenol (139 g/mol).

fd= factor de dilución, en el caso que sea necesario diluir.

Ps= gramos del suelo seco.