

DEPARTAMENTO DE CRISTALOGRAFÍA, MINERALOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA



**USO DE BIOESTIMULANTES OBTENIDOS A
PARTIR DE OKARA EN LA BIORREMEDIACIÓN
DE SUELOS CONTAMINADOS POR HERBICIDAS**

**EFFECTO EN PROPIEDADES
BIOLÓGICAS DEL SUELO**

MANUEL ORTIZ BOTELLA
SEVILLA, 2019



Uso de bioestimulantes
obtenidos a partir de okara en
la biorremediación de suelos
contaminados por herbicidas
**Efecto en propiedades biológicas
del suelo**

MANUEL ORTIZ BOTELLA

Memoria que presenta

Manuel Ortiz Botella

para optar al título de doctor
por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2019

**USO DE BIOESTIMULANTES OBTENIDOS A PARTIR DE
OKARA EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS
CONTAMINADOS POR HERBICIDAS. EFECTO EN
PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL SUELO.**

SEVILLA, 2019

LOS DIRECTORES

Dr. Manuel Tejada Moral Dr. Isidoro A. Gómez Parrales

Profesor Titular de la Universidad de Sevilla Profesor Titular de la Universidad de Sevilla



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA
Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola

DRA. ROSARIO VAZ PARDAL, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE CRISTALOGRAFÍA,
MINERALOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación, con título **“Uso de bioestimulantes obtenidos a partir de okara en la biorremediación de suelos contaminados por herbicidas. Efecto en propiedades biológicas del suelo”**, presentada por D. Manuel Ortiz Botella para optar al título de Doctor, ha sido realizada en el marco del Programa de Doctorado en Recursos Naturales y Medioambiente del Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola, bajo la supervisión de Isidoro Á. Gómez Parrales y Manuel Tejada Moral.

Firmado:

Dra. Rosario Vaz Pardal
Sevilla, 2019

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, tengo que expresar mi más sincero agradecimiento a la Junta de Andalucía y a la Universidad de Sevilla por la convocatoria del Plan de Empleo Juvenil, PEJUS-2, sin cuyo apoyo económico me habría sido imposible realizar este trabajo.

Para seguir, a mis directores y tutores: al Dr. Manuel Tejada Moral, Manolo, por aceptarme en su grupo como a uno más, confiar en mí y por hacerme reaccionar cuando me hacía falta; al Dr. Isidoro Gómez Parrales, Isi, por sus consejos y sus palabras de tranquilidad. A ambos, por haberme ayudado a crecer en esta etapa.

Al resto del departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola, por sus consejos y charlas en esos ratos entre prácticas; especialmente, a la Dra. Patricia Paneque Macías, por su trato y por enseñarme a dejar de ver el laboratorio como un biólogo, aunque solo fuese un rato.

A mis compañeros de laboratorio: a Adri, por aguantarme cuando necesitaba un amigo, y a Paloma, por ser mi amiga cuando necesitaba que alguien me aguantase. A ambos, por hacer más amenas las horas pegadas a un fregadero, por los cafés, las cervezas y porque nuestro tiempo no se acabase al salir de la escuela. A María José, por ser otra más, por todas las horas que hemos pasado hablando y por los viernes.

A mis amigos: gracias, a los que he hecho nuevos en esta ciudad, a las que me esperaban a cada viaje de regreso y a los de alrededores, porque han calmado mis idas y venidas y me han inspirado para seguir adelante.

Por último, a mi familia, especialmente a mi madre y a mis hermanas, por apoyarme desde que decidí que quería estudiar biología hasta esta etapa de mi carrera, porque no han dejado que me sienta lejos, a pesar de la distancia.

RESUMEN

El uso de plaguicidas durante las últimas décadas, unido al desarrollo de nuevas técnicas agrícolas y a la mejora y selección de nuevos cultivares, ha permitido un aumento de la producción y productividad de numerosos cultivos. Sin embargo, la aplicación de estos productos al suelo puede resultar en importantes consecuencias ambientales o sobre la salud humana y animal cuando no se hace de forma correcta. Por tanto, además de medidas preventivas, deben estudiarse y reconocerse nuevas técnicas remediadoras para controlar o subsanar los perjuicios cometidos. Una de estas técnicas es el desarrollo de bioestimulantes (BS) y su aplicación sobre suelos contaminados.

Recientemente, numerosos BS han sido obtenidos a partir de residuos orgánicos procedentes de diversas industrias. Entre estos residuos, encontramos lodos urbanos, restos de granjas avícolas o porcinas, extractos de materia vegetal, etc. Estas materias primas pueden someterse a procesos que hagan más accesibles los nutrientes a los microorganismos del suelo, como la hidrólisis enzimática.

En este trabajo se ha llevado a cabo el desarrollo de dos nuevos bioestimulantes a partir de una materia prima de origen vegetal con gran potencial, la okara de soja. Este subproducto tiene un elevado contenido en proteínas que lo hace especialmente interesante desde un punto de vista nutricional. Para el desarrollo de los bioestimulantes se emplearon dos enzimas: la subtilisina y la Flavourzyme; la primera de estas es una endoproteasa y la segunda, una exoproteasa. La primera se utilizó en el desarrollo del BS al que se denominó OB. La segunda se utilizó, en combinación con la primera, para originar el bioestimulante denominado OF.

Por otro lado, para la aplicación de estos bioestimulantes se seleccionó un suelo agrícola tipo Regosol calcárico, procedente de las inmediaciones de Montequinto, en el término municipal de Dos Hermanas, Sevilla. A este suelo se le aplicaron tres herbicidas de forma independiente y en combinación con los diversos bioestimulantes utilizando la metodología de microcosmos. Los herbicidas fueron oxifluorfen, diurón e imazamox; estos pertenecen a familias químicas distintas, con el fin de diversificar el conocimiento obtenido de la aplicación de los BS.

Los efectos de los herbicidas y de los bioestimulantes se analizaron mediante el seguimiento de distintos indicadores biológicos de calidad del suelo, como pueden ser determinadas actividades enzimáticas (actividades deshidrogenasa, ureasa, fosfatasa alcalina y β -glucosidasa) y el análisis de ácidos grasos derivados de fosfolípidos (PLFAs), a tiempos determinados. Los experimentos de microcosmos tuvieron una duración de 90 días en total, con muestreos en los días 5, 10, 20, 35, 55 y 90, en el caso de las actividades enzimáticas y de la medición de los niveles de herbicidas; y en los días 10 y 90, en el caso de los PLFAs.

Respecto a los bioestimulantes desarrollados en este trabajo, tras su caracterización, se comprobó que el BS OF tiene una mayor proporción de péptidos de bajo peso molecular (< 300 Da) que el BS OB debido a la acción conjunta de la endoproteasa y la exoproteasa.

En cuanto a la aplicación de estos productos en suelo, se confirma, a través de los bioindicadores seleccionados, el efecto bioestimulante y biorremediador de ambos, así como el efecto tóxico de los herbicidas sobre los microorganismos del suelo. Tanto la biorremediación como la bioestimulación fue, en general, mayor en el caso de los suelos enmendados con el BS OF debido, precisamente, a su mayor contenido en proteínas de bajo peso molecular y aminoácidos libres, que hacen más disponibles dichos recursos para la microbiota del suelo.

Los resultados y conclusiones de este trabajo demuestran el potencial de los bioestimulantes procedentes de hidrólisis enzimática de okara de soja como tales, además de justificar una mayor investigación de la aplicación de estos a diversas concentraciones, en distintos casos de contaminación por otros compuestos orgánicos y a otras escalas, para establecer con mayor exactitud el efecto de estos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Plaguicidas	2
1.1.1. Concepto	2
1.1.2. Dinámica de plaguicidas en el suelo.....	2
1.2.2. Procesos de transformación	10
1.1.3. Problemática de los plaguicidas en el medioambiente	12
1.2. Uso de la materia orgánica en la biorremediación de suelos contaminados por plaguicidas.....	15
1.2.1. Biosólidos.....	16
1.2.2. Estiércol	17
1.2.3. Compost	17
1.2.4. Restos de origen vegetal	19
1.2.5. Biorremediación con productos orgánicos hidrolizados	22
1.3. Índices de calidad del suelo	23
1.3.1. Concepto	23
1.3.2. Indicadores biológicos de la calidad del suelo.....	27
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
3.1. Características del suelo, la okara y los herbicidas	34
3.1.1. Características del suelo	34
3.1.2. Características de la okara	35
3.1.3. Herbicidas empleados	35
3.2. Proceso de hidrólisis enzimática para la obtención de los bioestimulantes	41
3.3. Diseño experimental.....	44
3.3.1. Primera experiencia de incubación.....	45
3.3.2. Segunda experiencia de incubación	47
3.3.3. Tercera experiencia de incubación	48
3.4. Determinaciones analíticas	49
3.4.1. Determinaciones analíticas en suelo	49
3.4.2. Caracterización de los hidrolizados	62
3.5. Análisis estadístico	63
4. RESULTADOS.....	65
4.1. Obtención de los bioestimulantes a partir de okara	66
4.2. Tratamiento estadístico de los datos de actividades enzimáticas	67
4.2.1. Actividad deshidrogenasa.....	67

4.2.2. Actividad fosfatasa	72
4.2.3. Actividad glucosidasa	76
4.2.4. Actividad ureasa	83
4.3. Tratamiento estadístico de los datos de concentración de herbicidas	87
4.4. Primera experiencia de incubación	92
4.5. Segunda experiencia de incubación	98
4.6. Tercera experiencia de incubación	105
5. DISCUSIÓN	111
5.1. Obtención de los nuevos bioestimulantes	112
5.2. Efecto de los bioestimulantes sobre las propiedades biológicas del suelo.	113
5.3. Efecto de los herbicidas sobre las propiedades biológicas del suelo.	117
5.4. Oxifluorfén.....	119
5.4.1. Efecto del oxifluorfén sobre las propiedades biológicas del suelo	119
5.4.2. Capacidad biorremediadora de los bioestimulantes	123
5.5. Imazamox.....	127
5.5.1. Efecto del imazamox sobre las propiedades biológicas del suelo	127
5.5.2. Capacidad biorremediadora de los bioestimulantes	130
5.5.3. Evolución del imazamox en suelo	134
5.6. Diurón	138
5.6.1. Efecto del diurón sobre las propiedades biológicas del suelo	138
5.6.2. Capacidad biorremediadora de los bioestimulantes	141
5.6.3. Evolución del diurón del suelo	144
6. CONCLUSIONES.....	145
7. BIBLIOGRAFÍA.....	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Destino de los pesticidas en suelo.....	3
Figura 2: Tipos de isotermas de adsorción.....	6
Figura 3: Estructura del herbicida oxifluorfén.....	36
Figura 4: Estructura del herbicida imazamox.....	38
Figura 5: Estructura del herbicida diurón.....	40
Figura 6: Obtención del bioestimulante OB.	42
Figura 7: Obtención del bioestimulante OF.....	44
Figura 8: Gráfico de perfiles para la actividad deshidrogenasa.....	69
Figura 9: Gráfico de perfiles para la actividad deshidrogenasa en el suelo control y en suelos contaminados con los tres herbicidas.....	70
Figura 10: Gráfico de perfiles para la actividad deshidrogenasa en suelos contaminados y no contaminados tratados.....	71
Figura 11: Gráfico de perfiles para la actividad fosfatasa.....	73
Figura 12: Gráfico de perfiles para la actividad fosfatasa en el suelo control y en los suelos contaminados con los tres herbicidas.....	74
Figura 13: Gráfico de perfiles para la actividad fosfatasa en suelos contaminados y no contaminados tratados con bioestimulantes.	75
Figura 14: Gráfico de perfiles para la actividad glucosidasa.....	77
Figura 15: Gráfico de perfiles para la actividad glucosidasa en el suelo control y en los suelos contaminados con los tres herbicidas.....	78
Figura 16: Gráfico de perfiles para la actividad glucosidasa en suelos contaminados y no contaminados tratados con bioestimulantes.	80
Figura 17: Gráfico de perfiles para la actividad glucosidasa en suelos contaminados y tratados con bioestimulantes.....	82
Figura 18: Gráfico de perfiles para la actividad ureasa.....	84
Figura 19: Gráfico de perfiles para la actividad ureasa en el suelo control y en suelos contaminados con oxifluorfén y diurón y tratados con bioestimulantes.	85
Figura 20: Gráfico de perfiles para la actividad ureasa en el suelo con imazamox y tratados con bioestimulantes.....	86
Figura 21: Gráfico de perfiles para la evolución de oxifluorfén en suelos enmendados y sin enmendar.....	89

Figura 22: Gráfico de perfiles para la evolución de imazamox en suelos enmendados y sin enmendar.....	90
Figura 23: Gráfico de perfiles para la evolución de diurón en suelos enmendados y sin enmendar.....	91
Figura 24: Evolución del contenido en oxifluorfén en suelos no enmendados y enmendados con los dos bioestimulantes experimentales.	97
Figura 25: Evolución del contenido en imazamox en suelos no enmendados y enmendados con los dos bioestimulantes experimentales.	103
Figura 26: Evolución del contenido en diurón en suelos no enmendados y enmendados con los dos bioestimulantes experimentales.....	109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: valores nutricionales de la okara por 100 g de producto húmedo.....	21
Tabla 2: Indicadores físicos, químicos y biológicos de la calidad del suelo.....	26
Tabla 3: Funciones de algunas actividades enzimáticas del suelo.....	29
Tabla 4: Características físico-químicas del suelo experimental.....	34
Tabla 5: Composición química y distribución del peso molecular de la proteína (Da) en el okara utilizado en la fabricación de bioestimulantes.....	35
Tabla 6: Tiempos de retención de la columna empleada en la cromatografía de exclusión y tamaños moleculares correspondientes.....	63
Tabla 7: Características químicas y distribución del peso molecular de las proteínas de los bioestimulantes obtenidos a partir de okara.....	66
Tabla 8: Prueba de esfericidad de Mauchly para la actividad deshidrogenasa del suelo control y de los suelos contaminados sin enmendar.....	69
Tabla 9: ANOVA de medidas repetidas para la actividad deshidrogenasa del suelo control y de los suelos contaminados sin enmendar.....	69
Tabla 10: Prueba de esfericidad de Mauchly para la actividad deshidrogenasa en los suelos contaminados y sin contaminar, enmendados con bioestimulantes.....	72
Tabla 11: ANOVA de medidas repetidas para la actividad deshidrogenasa en los suelos contaminados y sin contaminar, enmendados con bioestimulantes.....	72
Tabla 12: Prueba de esfericidad de Mauchly para la actividad fosfatasa del suelo control y de los suelos contaminados sin enmendar.....	74
Tabla 13: ANOVA de medidas repetidas para la actividad fosfatasa del suelo control y de los suelos contaminados sin enmendar.....	74
Tabla 14: Prueba de esfericidad de Mauchly para la actividad fosfatasa en los suelos contaminados y sin contaminar, enmendados con bioestimulantes.....	76
Tabla 15: MANOVA de medidas repetidas para la actividad fosfatasa en los suelos contaminados y sin contaminar, enmendados con bioestimulantes.....	76
Tabla 16: Prueba de esfericidad de Mauchly para la actividad glucosidasa del suelo control y de los suelos contaminados sin enmendar.....	78
Tabla 17: MANOVA de medidas repetidas para la actividad glucosidasa del suelo control y de los suelos contaminados sin enmendar.....	79

Tabla 18: Prueba de esfericidad de Mauchly para la actividad glucosidasa en los suelos contaminados y sin contaminar, enmendados con bioestimulantes.....	80
Tabla 19: MANOVA de medidas repetidas para la actividad glucosidasa en los suelos contaminados y sin contaminar, enmendados con bioestimulantes.....	81
Tabla 20: Prueba de esfericidad de Mauchly para la actividad glucosidasa en los suelos contaminados y tratados con bioestimulantes.....	82
Tabla 21: MANOVA de medidas repetidas para la actividad glucosidasa en los suelos contaminados y tratados con bioestimulantes.....	83
Tabla 22: Prueba de esfericidad de Mauchly para la actividad ureasa en los suelos sin contaminar y contaminados con oxifluorfén y diurón y enmendados con bioestimulantes.	85
Tabla 23: ANOVA de medidas repetidas para la actividad ureasa en los suelos sin contaminar y contaminados con oxifluorfén y diurón y enmendados con bioestimulantes.	85
Tabla 24: Prueba de esfericidad de Mauchly para la actividad ureasa en los suelos contaminados con imazamox y enmendados con bioestimulantes.	86
Tabla 25: ANOVA de medidas repetidas para la actividad ureasa en los suelos contaminados con imazamox y enmendados con bioestimulantes.	87
Tabla 26: Prueba de esfericidad de Mauchly para la degradación de oxifluorfén en suelos.	89
Tabla 27: ANOVA de medidas repetidas para la degradación de oxifluorfén en suelos.	89
Tabla 28: Prueba de esfericidad de Mauchly para la degradación de imazamox en suelos.	90
Tabla 29: ANOVA de medidas repetidas para la degradación de imazamox en suelos.	90
Tabla 30: Prueba de esfericidad de Mauchly para la degradación de diurón en suelos.	91
Tabla 31: ANOVA de medidas repetidas para la degradación de diurón en suelos.....	91
Tabla 32: Evolución de las actividades deshidrogenasa y ureasa en suelos enmendados con los bioestimulantes experimentales y contaminados con oxifluorfén.....	93
Tabla 33: Evolución de las actividades β -glucosidasa y fosfatasa en suelos enmendados con los bioestimulantes experimentales y contaminados con oxifluorfén.....	96

Tabla 34: <i>Evolución de bacterias Gram⁺, Gram⁻, bacterias totales PLFAs y hongos PLFAs (ng g⁻¹) para los tratamientos experimentales a los 10 y 90 días de incubación.</i>	98
Tabla 35: <i>Evolución de las actividades deshidrogenasa y ureasa en suelos enmendados con los bioestimulantes experimentales y contaminados con imazamox.....</i>	100
Tabla 36: <i>Evolución de las actividades β-glucosidasa y fosfatasa en suelos enmendados con los bioestimulantes experimentales y contaminados con imazamox.....</i>	101
Tabla 37: <i>Evolución de bacterias Gram⁺, Gram⁻, bacterias totales PLFAs y hongos PLFAs (ng g⁻¹) para los tratamientos experimentales a los 10 y 90 días de incubación.</i>	104
Tabla 38: <i>Evolución de las actividades deshidrogenasa y ureasa en suelos enmendados con los bioestimulantes experimentales y contaminados con diurón.....</i>	107
Tabla 39: <i>Evolución de las actividades β-glucosidasa y fosfatasa en suelos enmendados con los bioestimulantes experimentales y contaminados con diurón.....</i>	108
Tabla 40: <i>Evolución de bacterias Gram⁺, Gram⁻, bacterias totales PLFAs y hongos PLFAs (ng g⁻¹) para los tratamientos experimentales a los 10 y 90 días de incubación.</i>	110

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PLAGUICIDAS

1.1.1. CONCEPTO

De acuerdo con la FAO (2014), los plaguicidas pueden definirse como cualquier sustancia o mezcla de sustancias, de origen químico o biológico, cuyo propósito sea repeler, destruir o controlar cualquier plaga, o regular el crecimiento de una planta. Como consecuencia de ello, pueden contribuir tanto a la rentabilidad de un cultivo, ya que permite un aumento en la producción agrícola, como a la protección de los alimentos durante su producción y almacenamiento.

En la actualidad, los plaguicidas no solo se usan en agricultura, también son de gran importancia en silvicultura, producción ganadera y acuicultura en el control de plagas y las enfermedades que estas puedan transmitir. Esto hace pensar que a pesar de las nuevas tendencias agrícolas que se están imponiendo desde hace algunos años, como por ejemplo la agricultura ecológica, el uso de tales plaguicidas en muchas superficies agrícolas tiene todavía un importante peso específico (Calderón, 2017).

Debido a este aumento en el uso de insecticidas, acaricidas, herbicidas, fungicidas, etc., se hace necesario entender sus ciclos en el medioambiente, especialmente en el suelo, así como los efectos que pueden tener sobre la salud humana y sobre el equilibrio de los ecosistemas (Burrows et al., 2002).

1.1.2. DINÁMICA DE PLAGUICIDAS EN EL SUELO

Es imprescindible conocer los distintos tipos de procesos que puede sufrir un plaguicida tras su adición a un suelo puesto que estos son los que determinarán su potencial contaminante, su persistencia a largo plazo o su transporte a otros lugares.

La Figura 1 muestra un esquema de los principales procesos a los que se ve sometido un plaguicida en suelo.

Dentro de estos procesos, hay que destacar:

1. Procesos de transferencia o transporte.
2. Procesos de transformación.

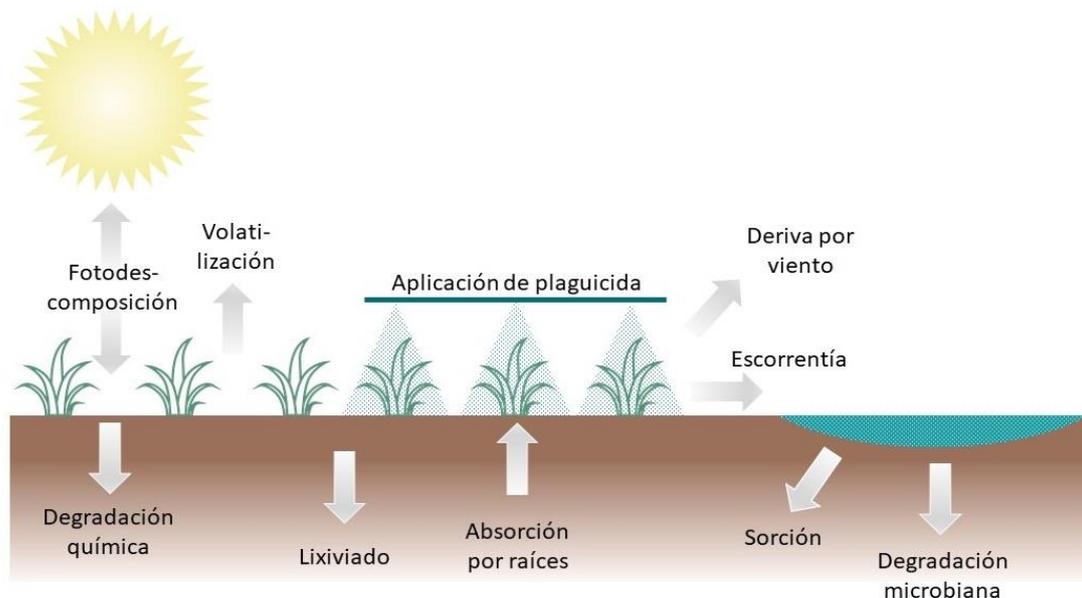


FIGURA 1: DESTINO DE LOS PESTICIDAS EN SUELO.

1.1.2.1. PROCESOS DE TRANSFERENCIA O TRANSPORTE

En los procesos de transferencia o transporte el plaguicida no sufre degradación o transformación de ningún tipo y, por tanto, su estructura no sufre cambios y su potencial es el mismo. El plaguicida se desplaza dentro de un medio o de un medio a otro. Dentro de estos, los más relevantes son la adsorción-desorción, absorción, infiltración, escorrentía, lixiviación y volatilización.

I. ADSORCIÓN-DESORCIÓN

De los numerosos procesos que determinan el comportamiento, evolución y destino de un plaguicida en suelo, la adsorción es con diferencia el más relevante. La adsorción determina la disponibilidad relativa del plaguicida en suelo, influyendo en su susceptibilidad al metabolismo microbiano, actividad biológica y distribución (transporte). La adsorción-desorción puede definirse como el cambio de un soluto de una fase sólida a una líquida o gaseosa y viceversa (Osgerby, 1970). A la fase sólida se la conoce como adsorbente y al compuesto que se une a ella, como adsorbato.

Las interacciones entre adsorbato y adsorbente pueden ser de diferente naturaleza, tanto químicas como físicas, como enlace iónico, fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, transferencia de carga o cambio de ligando.

La eliminación de los plaguicidas en fase líquida por la adsorción del suelo o su reincorporación a la fase líquida por adición de agua (desorción) son los factores de

mayor importancia en el control de la persistencia, la actividad y la movilidad del suelo (Wauchope y Koskinen, 1983). Cuando una parte del adsorbato se une de manera irreversible al adsorbente, hablamos de desorción parcial. Cuando esto no ocurre, la desorción puede ser total, en cuyo caso hablamos de adsorción reversible (Cox et al., 1995). La irreversibilidad también es conocida como histéresis.

La dinámica de adsorción-desorción está ampliamente estudiada y modelizada. Existe un flujo continuo de moléculas orgánicas que se desplaza entre la fase sólida y la líquida o gaseosa hasta que se llega a un equilibrio de adsorción. Este equilibrio es dinámico y viene a estar determinado por la expresión:

$$C_e \leftrightarrow C_s$$

Donde C_e indica el herbicida presente en la fase acuosa (disuelto) y C_s indica el herbicida presente en la fase sólida (adsorbido). El coeficiente de distribución que relaciona linealmente ambos términos es K_d , de manera que:

$$K_d = C_s/C_e$$

El coeficiente de distribución es útil a la hora de comparar el grado de adsorción de un compuesto determinado por diferentes suelos o, por el contrario, de diferentes compuestos por un mismo suelo bajo iguales condiciones experimentales

Debido a la importancia de los fenómenos de adsorción-desorción, el uso de isotermas de adsorción es una herramienta clave a la hora de predecir la movilidad o no de un herbicida en un sustrato dado. Estas isotermas describen la retención de una sustancia por un sólido a distintas concentraciones (Limousin et al., 2007).

Las isotermas para la adsorción de solutos orgánicos están divididas en cuatro clases principales, según la naturaleza de la pendiente de la parte inicial de la curva, de acuerdo a lo definido por Giles et al. (1960). Una representación gráfica de estas curvas puede encontrarse en la Figura 2.

Dentro de dichas isotermas se pueden destacar:

- Isoterma S: de forma sigmoïdal, el comienzo de la curva demuestra que lo que ocurre es que la adsorción se facilita según aumenta la concentración del soluto. Tienen lugar cuando se cumplen las siguientes condiciones: el soluto tiene un único sitio de reacción (es monofuncional), la interacción solvente-soluto es moderada, haciendo que se coloque de forma vertical, y existe una competición fuerte por los sitios por parte de otras moléculas disueltas por el mismo solvente.

- Isoterma L: en este caso, según aumenta el número de sitios ocupados por el sustrato, más difícil resulta que nuevas moléculas de sustrato encuentren un sitio disponible. El resultado es una curva cóncava, en la que el sustrato se satura de forma progresiva. Esto sugiere que las moléculas de soluto adsorbidas no están dispuestas de forma vertical, como en el caso anterior, o que la competencia por el solvente no es fuerte.
- Isoterma H: las curvas H son un caso especial de las curvas L en la que se muestra una alta afinidad entre el soluto y el adsorbente, lo que, en el caso de disoluciones diluidas, supone una adsorción total (Calderón, 2017).
- Isoterma C: donde la cantidad adsorbida es directamente proporcional a la cantidad de soluto que hay en disolución (Calderón, 2017).

Existen diversos factores que influyen en estos procesos de adsorción-desorción, entre los que podemos destacar:

a) Propiedades físico-químicas del plaguicida.

Entre las propiedades físico-químicas más influyentes en los fenómenos de adsorción destacan:

- Tamaño molecular: el tamaño molecular puede influir en la adsorción de las moléculas por su influencia en el volumen y área de la molécula. El volumen, además, está relacionado con la solubilidad en agua. El volumen de la molécula determina los *loci* de la superficie adsorbente en los que potencialmente puede alojarse, lo cual determinará su actividad biológica y qué otros factores pueden influir sobre la molécula adsorbida (Lambert, 1967).

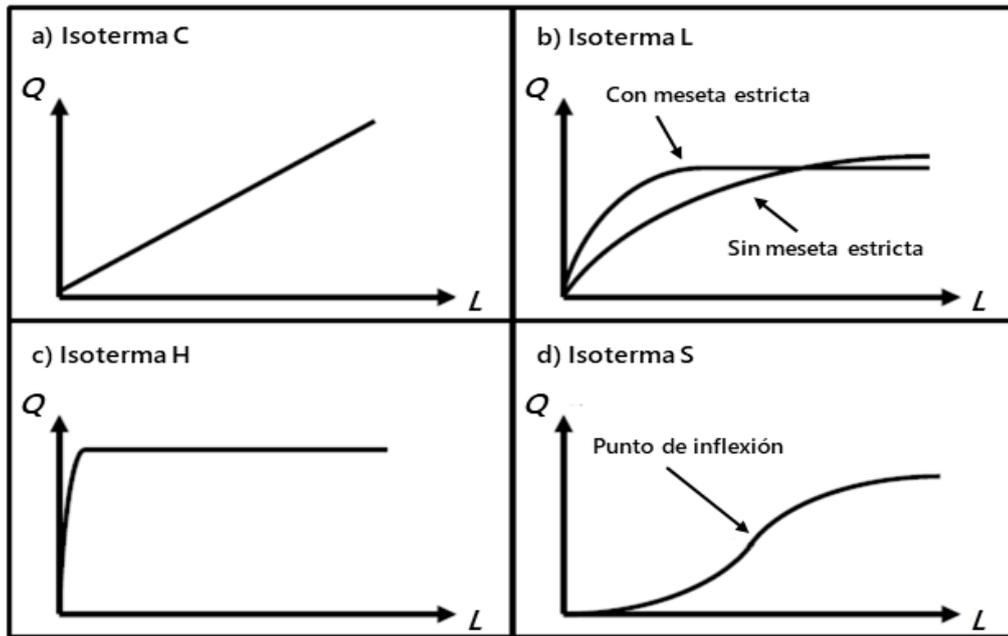


FIGURA 2: TIPOS DE ISOTERMAS DE ADSORCIÓN.

- Estructura electrónica: deben tenerse en cuenta la polaridad de la molécula (según su distribución electrónica), la deslocalización de la carga en moléculas con dobles y triples enlaces y, por último, la polarizabilidad, es decir, la facilidad con la que la nube de electrones se deforma bajo la presencia de un campo eléctrico (Calvet, 1989).
- Ionización: la capacidad de ionizarse de moléculas orgánicas depende de su estructura electrónica. Asimismo, si estas moléculas actúan como ácidos o bases fuertes, o ácidos o bases débiles también determinará su capacidad para ionizarse, afectando esto también a la carga. Esta propiedad es muy dependiente del pH de la disolución del suelo.

- Coeficientes de partición: algunas de las propiedades ambientales más importantes, como la solubilidad en agua, la solubilidad en solventes orgánicos o al misma adsorción por el suelo son coeficientes de partición (Briggs, 1981). La solubilidad en agua puede ser considerada un coeficiente de partición entre el agua y la molécula orgánica. Los plaguicidas (y otros productos de uso agrícola) hidrofóbicos tienden a tener vidas medias más largas en suelo y, por tanto, mayor riesgo como contaminantes (Noble, 1993). Sin embargo, la solubilidad en agua de compuestos químicos orgánicos varía enormemente dependiendo de la especie (Kenaga y Goring, 1980) y sacar conclusiones empíricas claras y generales es, cuanto menos, difícil (Calvet, 1989). Aunque la correlación negativa entre solubilidad en agua y adsorción suele mantenerse, algunos compuestos polares no cumplen dicha norma (Calvet, 1989).

b) Composición coloidal del suelo

Se han destacar los compuestos orgánicos (materia orgánica humificada) y compuestos inorgánicos (arcilla). Dentro de los compuestos orgánicos, habría que destacar la composición química de dicha materia orgánica; en concreto, el contenido en ácidos húmicos y fúlvicos, ya que la adsorción del plaguicida por parte de la materia orgánica es tanto mayor cuanto mayor es el contenido de ácidos húmicos (Tejada y Benítez, 2017). Respecto a las arcillas, se ha de destacar el tipo de estructura de las mismas. En este sentido, la capacidad de adsorción es mayor en arcilla de estructura tipo 2/1 que tipo 1/1 (Calderón, 2017).

c) pH de la disolución.

El pH es un parámetro muy importante en procesos de adsorción de plaguicidas ionizables, como son aquellos que suelen poseer grupos funcionales ácidos o básicos débiles, y que tienden a encontrarse de forma ionizada (Kah y Brown, 2006). De modo que compuestos básicos débiles a valores de $\text{pH} < \text{pK}_a$ estarán de forma protonada, favoreciéndose así la adsorción a los coloides.

d) Otros factores.

La humedad, la temperatura o el tiempo de residencia del plaguicida en el suelo también son de gran influencia. En general, la adsorción del plaguicida aumenta al

disminuir el contenido en agua del suelo y la temperatura; y al aumentar el tiempo de residencia del plaguicida en el suelo (Calderón, 2017).

II. ABSORCIÓN

Las plantas y microorganismos del suelo son capaces de absorber compuestos como herbicidas, pudiendo acumularlos, metabolizarlos y transformarlos en otras moléculas o devolverlos al medio (exudación). La absorción de herbicidas viene determinada por su disponibilidad, es decir, por su fijación por parte de los coloides del suelo (Calderón, 2017).

III. INFILTRACIÓN

La infiltración es el movimiento vertical que se da, debido a la gravedad y a la capilaridad, en los primeros centímetros del suelo. La sufre un herbicida al pasar desde la superficie del suelo hacia el interior, con anterioridad al fenómeno de lixiviación. La infiltración se relaciona directamente con la estructura porosa del suelo, la estabilidad estructural y la densidad aparente (Azooz y Arshad, 1996). La infiltración de plaguicidas supone una disminución de la cantidad disponible para otros fenómenos como escorrentía superficial y lixiviación. De esta manera, todos los procesos que favorezcan la retención de los plaguicidas en la capa superficial del suelo, disminuirán su potencial contaminante de aguas y de otros suelos cercanos por transporte. Por otro lado, la infiltración, al introducir las moléculas del plaguicida en la capa superficial del suelo, favorece los procesos que impiden su lixiviado, como pueden ser la adsorción en los coloides y la absorción y biodegradación por plantas y microorganismos.

IV. ESCORRENTÍA

La escorrentía tiene lugar cuando la tasa de precipitación o de riego supera la capacidad de infiltración del suelo. La pérdida por movimiento lateral de un plaguicida se ve favorecida por una topografía abrupta, baja permeabilidad del suelo y por la intensidad y duración de las precipitaciones (Helling et al., 1971). La pérdida de herbicidas por escorrentía es mayor cuanto menor es el tiempo que pasa entre la aplicación y las precipitaciones causantes de la escorrentía.

V. LIXIVIACIÓN

La lixiviación es el proceso mediante el cual el agua de lluvia o riego disuelve y/o arrastra moléculas presentes en el suelo, originando un movimiento vertical y a favor de la gravedad en el perfil del suelo. El arrastre de plaguicidas puede provocar pérdidas, contaminación de lugares cercanos, contaminación de acuíferos, etc. Aunque está muy ligada al fenómeno de difusión, la difusión solo tiene un alcance de unos pocos centímetros dentro del suelo (Hartley, 1960).

Numerosos factores influyen en el lixiviado de plaguicidas.

- **Propiedades del plaguicida:** Características como su estructura, capacidad para protonarse y desprotonarse, hidrofobicidad, solubilidad en agua o presión de vapor afectarán a la retención del plaguicida por parte de los coloides del suelo (Calderón, 2017).
- **Adsorción por los coloides del suelo:** los minerales de la arcilla y la materia orgánica son los principales responsables de retener a los plaguicidas en el suelo. La materia orgánica tiene mayor influencia en la retención de la mayoría de compuestos que las arcillas (Helling et al., 1971).
- **Textura y estructura del suelo:** relacionado con el punto anterior, suelos con textura más gruesa tienen mayor capacidad para evitar el lixiviado de plaguicidas al tener, habitualmente, mayor contenido en materia orgánica o arcillas y una mayor capacidad de campo (Helling et al., 1971). Por otro lado, suelos formados por agregados mayores, con sistemas de poros donde predominen los macroporos, tienen mayor capacidad para el transporte de plaguicidas a mayores profundidades (Flury, 1996).
- **Aporte de agua y presencia de agua inicial:** La retención de plaguicidas en el suelo aumenta con el tiempo. Así, como se ha comentado antes, el aporte de agua (de lluvia o por riego) poco después de la aplicación de un plaguicida también aumenta el lixiviado de los mismos.
- **Prácticas culturales.** El tipo de laboreo que se establezca en un determinado cultivo puede influir notablemente en la lixiviación de plaguicidas, principalmente cuando se trate de un sistema como el laboreo tradicional (Calderón, 2017). Al realizar labores profundas donde se destruye la estructura del suelo, se originan grietas que hacen que los plaguicidas se pierdan con mayor facilidad. La aplicación de materia orgánica al suelo hace disminuir los

procesos de lixiviación al ser retenidos por procesos de adsorción (Cox et al., 2007).

VI. VOLATILIZACIÓN

La volatilización puede definirse como el paso de un herbicida de estado sólido o líquido a gas y su transporte por la atmósfera. Suele ocurrir tras las primeras horas de aplicación y en dos fases; primero tiene lugar el paso a fase gaseosa y después, la dispersión por difusión y turbulencia que lo mezcla con la atmósfera.

Los factores que más afectan a la volatilización son las características físico-químicas del compuesto, las condiciones climáticas (temperatura, humedad del suelo, tipo de cultivo, incidencia de la luz solar, turbulencia del aire, etc.), así como las prácticas que se lleven a cabo en el cultivo (Bedos et al., 2002).

VII. DIFUSIÓN

Es el proceso por el cual un compuesto se mueve en el suelo dentro de la misma fase (sólida, líquida o gaseosa). Puede estar afectada por las características moleculares del herbicida, la adsorción, el contenido en humedad y el tiempo. La humedad tiende a aumentar la difusión de determinados plaguicidas, pero para otros, como es el caso del herbicida trifluralina, puede disminuirlo, pues este tiene mayor tendencia a moverse en la fase gaseosa (Giles et al., 1960). De entre estos factores, la solubilidad y la presión de vapor del plaguicida son los más importantes (Helling et al., 1971).

1.2.2. PROCESOS DE TRANSFORMACIÓN

Los procesos de transformación son aquellos en los que el compuesto original se transforma o degrada, dando lugar a compuestos con una estructura distinta a la del original. La toxicidad del herbicida puede aumentar, disminuir o desaparecer por completo. Los más importantes son la degradación química, biológica y la fotodegradación.

I. DEGRADACIÓN QUÍMICA

Entre las reacciones químicas que pueden degradar plaguicidas podemos distinguir aquellas catalizadas por el suelo y aquellas que no lo son. Las reacciones químicas más

comunes que suelen ocurrir en el suelo son la hidrólisis, la oxidación y la isomerización (Helling et al., 1971).

Las reacciones catalizadas por el suelo suelen estar relacionadas con los minerales de la arcilla y, en concreto, con su naturaleza ácida. Aunque estas reacciones suelen estar investigadas solo en condiciones que no suelen darse en el suelo (a elevadas temperaturas y en disolventes no acuosos) sirven como guía de los efectos que pueden tener en los distintos plaguicidas en suelo.

II. DEGRADACIÓN BIOLÓGICA

La degradación biológica es la que se da gracias a los organismos vivos del suelo, principalmente bacterias y hongos. Está afectada por la actividad y distribución de los mismos, y por las condiciones ambientales (temperatura y contenido en humedad). Pueden degradar el plaguicida total o parcialmente. Si es total, se originará CO_2 , H_2O y CH_4 . Si es parcial pueden originar metabolitos que pueden presentar una toxicidad igual, menor o superior al compuesto de partida (Calderón, 2017).

III. FOTODEGRADACIÓN

La fotodegradación es un proceso abiótico de transformación en el que la excitación electrónica por absorción de luz origina reacciones orgánicas. En dichas reacciones se generan especies reactivas de oxígeno, como OH^* , O_3 y $^1\text{O}_2$, que oxidan los grupos funcionales del plaguicida. Es difícil hacer generalizaciones debido a la diversidad de plaguicidas que existen y se comercializan, así como a la variedad de condiciones meteorológicas y ambientales que pueden influir (Katagi, 2004).

Los factores que afectan a la fotodegradación de los plaguicidas son el tiempo de exposición, el pH del suelo, la porosidad, el estado del plaguicida y su modo de aplicación, el grado de adsorción del mismo y la presencia de otras especies catalíticas en el medio.

Debido a que es un proceso dependiente de la incidencia de la luz directa, solo afecta a los plaguicidas presentes en superficie. La presencia en suelo de materia orgánica facilita la fotólisis de los plaguicidas, acelerando este proceso (Konstantinou et al., 2001).

1.1.3. PROBLEMÁTICA DE LOS PLAGUICIDAS EN EL MEDIOAMBIENTE

Actualmente, está demostrado que la aplicación de plaguicidas puede causar importantes problemas a la salud humana, así como en el equilibrio de los ecosistemas.

Desde el punto de vista de la salud humana, se tiene constancia que los plaguicidas pueden ser la causa de importantes efectos tóxicos tales como envenenamiento (Richter, 2002; Pimentel y Burgess, 2005), cáncer, destacando cáncer de labio, enfermedad de Hodgkin, melanoma maligno, mieloma múltiple, cáncer de estómago, de próstata, de mama, de cerebro y leucemia (Blair et al., 1992; Meyer et al., 2003; Engel, 2005; Miranda-Filho et al., 2012) y diversos efectos neurotóxicos como cefaleas, mareos, náuseas, vómitos (Alavanja et al., 2004).

Todos estos efectos nocivos llevados a cabo por los plaguicidas descritos para la salud humana son consecuencia del contacto de dichos compuestos químicos con los humanos.

Son varios los mecanismos por los que los humanos podemos entrar en contacto directo con dichos plaguicidas:

a) Consumo directo en alimentos al no respetar el denominado límite máximo de residuos en alimentos.

Este parámetro, que generalmente se determina en el momento de la recolección, nos indica la máxima cantidad de un plaguicida que puede admitirse en cualquier alimento (animal o vegetal) e incluso bebidas (alcohólicas o no alcohólicas) y el periodo de seguridad en los alimentos. Cualquier acción que implique no respetar este límite de residuos puede suponer la ingesta de alimentos contaminados por plaguicidas que pueden causar los efectos nocivos anteriormente descritos.

b) Debido a la contaminación de aguas subterráneas riego plantas.

Los productos fitosanitarios liberados al medio ambiente de forma incontrolada pueden llegar a causar problemas muy severos de contaminación de aguas subterráneas y cauces fluviales por fenómenos de lixiviación o de escorrentía.

El reciente informe fruto de la colaboración de Ecologistas en Acción y Pesticide Action Network Europe refleja la detección de hasta 47 plaguicidas distintos en las aguas españolas, de los cuales 21 son insecticidas, 19 son herbicidas y 5 son fungicidas. El informe alerta de que muchos de estos plaguicidas son compuestos químicos prohibidos en la Unión Europea, pero con alto poder de persistencia, como el DDT, la atrazina o el endosulfán. Además, alerta de que 26 de los plaguicidas encontrados son

disruptores endocrinos o hay indicios para pensar que pueden serlo (Balaguer et al., 2018).

Ecologistas en Acción advierte, sin embargo, que el informe resulta incompleto debido al limitado número de estaciones de control y a que estas no examinan todos los plaguicidas activos que se comercializan (aproximadamente 400, según el Registro de Productos Fitosanitarios). Las cuencas hidrográficas más contaminadas son, como cabría esperar, las que están presentes en zonas con mayor agricultura intensiva, como la del Júcar o la del Ebro (Balaguer et al., 2018). Es desconocido el efecto concreto que estas mezclas de plaguicidas pueden tener en conjunto, pero está comprobado que la exposición simultánea a diversos plaguicidas disruptores endocrinos puede tener un efecto tóxico acumulativo o incluso sinérgico (Hass et al., 2012). La diversidad y cantidad de sustancias químicas, así como el elevado número de combinaciones posibles de estas, hace urgente una evaluación del riesgo que puede suponer la exposición a las mezclas más probables.

En este aspecto relacionado con la contaminación de ríos, es necesario también destacar que los plaguicidas transportados en ríos tienen su camino final hacia mares y océanos, pudiendo pasar a los distintos organismos que habitan en dicho ecosistema, provocando toxicidad en los mismos. Cuando una persona se alimenta de ellos, dichos plaguicidas pueden también actuar ejerciendo los diferentes efectos tóxicos descritos con anterioridad.

Por otro lado, la presencia de plaguicidas en el medioambiente y en sistemas agrícolas puede llevar al envenenamiento de animales domésticos y silvestres. Respecto a los domésticos, perros y gatos son los animales más afectados, debido a que suelen tenerse en el entorno agrícola (como defensa, control de otros animales de menor tamaño o como compañía) y a que suelen moverse sin supervisión humana. En cuanto a animales domésticos de consumo, a las pérdidas por envenenamiento se añaden las pérdidas económicas que genera la contaminación de carne, leche y huevos por presencia de plaguicidas. Una estimación de las pérdidas económicas y en número de animales puede encontrarse en Pimentel y Burgess (2005).

En la naturaleza, el envenenamiento de animales silvestres puede darse de forma directa o de forma indirecta. Dentro de la forma directa puede encontrarse el consumo accidental por parte de los animales o el envenenamiento deliberado e ilegal

(Berny, 2007). Este último suele ser debido a competencia de los depredadores naturales con las costumbres de los habitantes locales, ganaderos o cazadores.

Como se ha mencionado antes, la presencia de plaguicidas en el medio, no solo el consumo directo o indirecto, pueden llevar a problemas en la salud de la fauna. La ocurrencia de cáncer es escasa, pero otros efectos más comunes son la disrupción endocrina, la disminución de la fertilidad, alteraciones etológicas e inmunotoxicidad. En aves, por ejemplo, puede darse una reducción de la producción de huevos y la alteración del tiempo dedicado a la búsqueda de alimento (Berny, 2007).

Los herbicidas, en concreto, tienen baja toxicidad en vertebrados pues su mecanismo de acción se encuentra relacionado con el metabolismo de las plantas. La mayoría de los compuestos, además, tienen baja afinidad por lípidos y son muy solubles en agua. Los herbicidas responsables (o sospechosos de serlo) de envenenamiento de vertebrados suelen ser herbicidas antiguos, ahora prohibidos (Freemark, 1995).

Los insecticidas aplicados para el control de artrópodos con carácter de plaga en determinados cultivos pueden también actuar sobre artrópodos beneficiosos, entre los que podemos encontrar depredadores naturales, parásitos, parasitoides y otros insectos beneficiosos para la especie humana, como polinizadores. Insectos y artrópodos evolutivamente cercanos representan un 90% de las especies de animales y plantas globales y su pérdida, en cantidad y diversidad, puede conllevar un grave peligro para los ecosistemas de los que forman parte (Pimentel, 1994).

Los insectos polinizadores son otros de los grandes afectados por el uso y abuso de plaguicidas, en especial de insecticidas. Otras de las causas para la disminución de número y diversidad de polinizadores, en especial de ápidos, son los cambios en el uso del suelo y la introducción de especies alóctonas. La transformación de una agricultura tradicional a una intensiva, normalmente con una única especie (monocultivo), no solo favorece la pérdida y fragmentación del hábitat, sino que aumenta la cantidad de herbicidas e insecticidas utilizados. Esto disminuye directamente las poblaciones de polinizadores por envenenamiento y por pérdida de recursos (Klein et al., 2007; Ricketts et al., 2008; Aizen et al., 2009; Winfree et al., 2009). Además, la tendencia es al aumento de la demanda de polinizadores, sobre todo en el caso de países en vías de desarrollo, que pueden sufrir un cambio de cultivos no dependientes de polinizadores hacia otros que sí lo son (Aizen et al., 2009).

Por otra parte, la preocupación por el efecto que puedan tener plaguicidas y otros compuestos xenobióticos en la microbiota del suelo es creciente, debido a que estos pueden influir directamente en la productividad de los cultivos, sostenibilidad del suelo y calidad medioambiental. La estructura, diversidad y actividad metabólica son factores cruciales a la hora de evaluar dichos efectos (Topp, 2003; Imfeld y Vuilleumier, 2012).

En este sentido, diversos estudios han puesto de manifiesto el efecto tóxico que ejercen diferentes plaguicidas sobre la actividad bioquímica de los microorganismos del suelo, así como su diversidad en dicho ecosistema. Así, Franco-Andreu et al. (2016) observaron tras la aplicación del herbicida oxifluorfén al suelo a la dosis recomendada por el fabricante (2 L ha^{-1}) una disminución significativa de diferentes actividades enzimáticas del suelo (deshidrogenasa, ureasa, β -glucosidasa y fosfatasa) durante los primeros 100 días después de su aplicación. Tras este tiempo y después de ser degradado dicho herbicida, dichas actividades enzimáticas comenzaron a aumentar, indicando en consecuencia el efecto tóxico de dicho herbicida sobre los microorganismos del suelo.

Estudios llevados a cabo Tejada et al., (2017) demostraron que tras la aplicación del herbicida diurón al suelo a dosis de 2 Kg ha^{-1} , se produjo una disminución significativa de las actividades enzimáticas deshidrogenasa y β -glucosidasa.

Del mismo modo, la aplicación del insecticida clorpirifós al suelo a dosis de 5 L ha^{-1} causó una disminución comprendida entre 55% y 58% de las actividades enzimáticas deshidrogenasa, ureasa, β -glucosidasa y fosfatasa, así como una disminución en la población de bacterias Gram+, Gram- y fúngica del suelo (Tejada et al., 2014; Orts et al., 2017).

1.2. USO DE LA MATERIA ORGÁNICA EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR PLAGUICIDAS

El concepto de remediación, hace referencia a la aplicación de estrategias físico-químicas y biológicas para evitar el daño y la contaminación de los suelos.

En la actualidad, un gran número de contaminantes como hidrocarburos aromáticos policíclicos, petróleo y derivados, herbicidas, clorofenoles y metales pesados son incorporados al suelo como resultado de la actividad industrial y agrícola, ocasionando graves problemas de contaminación que afectan a su funcionalidad y a la

salud medioambiental. Como consecuencia de ello, se suelen emplear diversas técnicas de remediación con el objeto de disminuir o eliminar dicha toxicidad causada por tales contaminantes.

Dentro de las distintas técnicas de remediación hay que destacar técnicas físicas, químicas y biológicas. Las técnicas de remediación químicas o físicas suelen tener costes muy elevados o no ser del todo efectivas, a diferencia de las técnicas biológicas que son más efectivas y menos costosas (M. Chen et al., 2015).

Las técnicas de remediación biológicas, también conocidas como biorremediación, consisten en utilizar las habilidades metabólicas y el potencial de los microorganismos para la degradación de los contaminantes citados en diversos medios, como el suelo o medios acuáticos. La biorremediación, además, ha de llevarse a cabo en medio abierto, y no estéril, que contenga una gran variedad de microorganismos. De estos, las bacterias suelen tener un papel crucial; otros organismos, como hongos y protozoos también pueden afectar al proceso (Watanabe, 2001).

Dentro de las diferentes técnicas de biorremediación, una de las más usadas debido principalmente a su alta eficacia y bajo coste económico es el empleo de distintas fuentes de materia orgánica. Con la aplicación de dicha materia orgánica, se pretende estimular a la población microbiana tolerante, acelerando de esta forma la degradación de los diferentes compuestos tóxicos orgánicos (Tejada et al., 2010a; Gómez et al., 2014).

Por otra parte, es también importante considerar la capacidad de adsorción de las sustancias húmicas sobre dichos compuestos tóxicos, provocando una disminución en la concentración de los mismos en la solución del suelo, y en consecuencia, una disminución de los efectos tóxicos de dichos contaminantes (Dolaptsoglou et al., 2007; Delgado-Moreno y Peña, 2009; Tejada et al., 2011b).

A continuación, dentro de las distintas fuentes de materia orgánica usadas en procesos de biorremediación de suelos contaminados por plaguicidas, se hará un breve repaso por las más comúnmente utilizadas.

1.2.1. BIOSÓLIDOS

Los biosólidos, también conocidos como lodos de depuradora estabilizados, son subproductos de aguas municipales y restos del sistema de aguas residuales. Estos

residuos son sometidos a tratamientos para eliminar la mayor cantidad de agua posible, así como a diversos tratamientos de digestión aeróbica o anaeróbica. Esto los lleva a tener un contenido final de materia orgánica de entre un 50% y un 60%. Son también una fuente de nitrógeno, fósforo y, en menor medida, potasio. Sin embargo, los biosólidos también pueden tener un alto contenido en sustancias peligrosas como metales pesados, compuestos orgánicos de baja biodegradabilidad y organismos patógenos como virus y bacterias, limitando su uso potencial en agricultura (Cartagena, 2005).

Durante muchos años ha habido un amplio debate sobre la efectividad o no de dichos residuos orgánicos en la degradación de plaguicidas en suelo. En este sentido, algunos autores como Perrin-Ganier et al. (2001), no encontraron efecto en la degradación del herbicida isoproturón. Contenidos elevados de metales pesados pueden modificar la tasa de degradación de plaguicidas, complicando todavía más la aplicación de biosólidos como agente bioestimulante.

1.2.2. ESTIÉRCOL

El estiércol como enmienda orgánica ha demostrado ser capaz de contribuir a la degradación de atrazina y metolaclo cuando es añadido en concentraciones de 0.5% y 5% (p/p) respectivamente (Moorman et al., 2001). Doyle et al. (1978) documentan un incremento de la degradación de plaguicidas metabolizados por reacciones de desalcalinización (fenilureas, s-triazinas, etc.) con la adición de estiércol de vaca. También se cita la degradación de plaguicidas como el fonofós, terbufós y forato (Somasundaram et al., 1987), así como el de la permetrina (Doyle et al., 1981), el carbofurano (Koeppel y Lichtenstein, 1984) y el metil isotiocianato (Dungan y Yates, 2003).

Otros tipos de estiércol, como por ejemplo el de oveja, han ocasionado resultados muy positivos en la disminución de oxifluorfén en la solución del suelo debido tanto a su capacidad bioestimulante como su capacidad de adsorción (Gómez et al., 2014).

1.2.3. COMPOST

La adición de compost como enmienda orgánica puede aumentar la fertilidad del suelo y el contenido de materia orgánica, además de tener efectos biorremediativos. El

compostaje es una de las soluciones más económicamente efectivas para la biorremediación del suelo (Chen et al., 2015).

Barriuso et al., (1997) emplearon compost procedente de sólidos de aguas municipales y diversos herbicidas con el fin de caracterizar la sorción, mineralización y extractabilidad de los residuos. Los herbicidas utilizados fueron: atrazina, simazina, terbutrina, pendimetalina, carbetamida, 2,4-D, metsulfurón metil y dimefurón. La adición de compost generalmente provocó una disminución de la mineralización al favorecer la estabilización de los residuos de herbicida. De acuerdo a estos autores, el aumento del contenido en materia orgánica derivado del compost puede ser responsable en parte de la estabilización de los residuos de herbicida, al menos en el caso de los que presentaron una alta sorción. Sin embargo, es imposible separar el efecto del aumento de la materia orgánica de la mayor actividad de los microorganismos tras la adición de compost. Esta tuvo escaso efecto sobre los herbicidas menos sorbidos (carbetamida, 2,4-D, metsulfurón metil y dimefurón).

En el trabajo de Said-Pullicino et al., (2004) se añadió compost de residuos sólidos urbanos con el objetivo de estudiar el efecto sobre las interacciones entre el suelo y el herbicida triasulfurón. Este herbicida es una sulfonilurea utilizado en el tratamiento de gramíneas en postemergencia. En general, la adición de compost aumentó la adsorción del herbicida por el aumento del contenido en materia orgánica. Asimismo, se aumentó también la hidrólisis del herbicida, al menos en las primeras fases del experimento, donde dominaba la biodegradación sobre la degradación química.

También, Miller et al., (2004) observaron una disminución del contenido de PCP del 76% en suelos contaminados tratados con compost de residuos sólidos municipales. Estos autores sugieren que el compost empleado es una muy buena solución para la descontaminación de suelos, pero advierten de la dependencia del tratamiento del suelo en particular y de la necesidad de realizar estudios previos antes de emprender proyectos a gran escala.

Del mismo modo, Gómez et al. (2014) encontraron un descenso importante de la toxicidad del herbicida oxifluorfén tras la aplicación de un compost de residuos sólidos urbanos. Por último, Delgado-Moreno y Peña (2009) observaron un descenso de la toxicidad de triazinas tras la adición de un compost obtenido a partir de residuos de la industria olivarera.

1.2.4. RESTOS DE ORIGEN VEGETAL

Dentro de este apartado se pueden destacar distintos compuestos orgánicos que mostraron una gran efectividad en la biorremediación de plaguicidas en suelo.

En este sentido podemos destacar el serrín de madera de pino y roble en la biorremediación de suelos contaminados por metolacoloro, linurón y terbutilazina (Moorman et al., 2001; Grenni et al., 2009; Grenni et al., 2012).

Lo mismo puede ocurrir con otros restos procedentes de madera, como el biochar. Este producto puede reducir la disponibilidad de plaguicidas como el clorpirifós, el carbofurán, el pirimetanil y el diurón (Yang y Sheng, 2003; Yu et al., 2009, 2010). Pese a la reducción de la disponibilidad de plaguicidas derivada de las particulares propiedades del biochar, es posible que estos productos aumenten la actividad microbiana de tal forma que aumente la biodegradación, al menos, en fases iniciales del proceso (Zhang et al., 2005; Kookana, 2010).

La turba es capaz de aumentar la degradación de herbicidas como la atrazina (Moorman et al., 2001). Sin embargo, el uso de la turba como enmienda orgánica, de forma similar al del biochar, puede aumentar el coeficiente de sorción de los plaguicidas, como es el caso del etametsulfurón metil, la atrazina, el MCPA, el mecoprop o el diclorprop (González-Pradas et al., 1999; Romero et al., 2001; Si et al., 2006)

También, restos agrícolas como tallos de maíz o rastrojos de soja han demostrado aumentar la degradación de plaguicidas como la atrazina, el metolacoloro y el alaclor (Felsot y Dzantor, 1992; Moorman et al., 2001). Dzantor et al. (1993) estudiaron la capacidad biorremediadora de la harina de maíz en suelos contaminados con diversos plaguicidas. Después de 100 días de tratamiento observaron un aumento de la degradación de los plaguicidas alaclor y trifluralina. En un trabajo similar (Felsot y Dzantor, 1990) estudiaron la degradación del herbicida alaclor a diversas concentraciones (10 ppm y 1.000 ppm) en suelos contaminados tratados con rastrojos de soja y, de nuevo, harina de maíz. Ambas enmiendas, pese a sus diferencias, estimularon la degradación del herbicida a bajas concentraciones, pero no a 1.000 ppm.

Wagner y Zablotowicz (1997) estudiaron el efecto de otras materias orgánicas de origen vegetal, como la harina de maíz y restos de vallico (*Lolium rigidum* (Gaudin) Weiss ex Nyman, una gramínea de interés forrajero), sobre la degradación de los herbicidas cianazina y fluometurón. La harina de maíz redujo la vida media de la cianazina de 28,3 días a 21 y de 66,4 a 41 en el caso del fluometurón. De forma similar,

los restos de vallico redujeron la vida media de la cianina de 28,3 a 18,2 y, en el caso del flumetrón, de 66,4 a 27,7. Estos efectos son derivados de la mejora del estado de los microorganismos del suelo, apreciable por el aumento de la hidrólisis de FDA (diacetato de fluoresceína) que citan los autores.

Una estrategia similar fue empleada por Moorman et al. (2001) para estudiar el efecto de diversas materias orgánicas en la degradación de atrazina, metalocloro y trifluralina. Entre las materias orgánicas estudiadas se encontraba una a base de rastrojos de maíz. Estos restos vegetales, aplicados a una concentración del 5% (p/p), mejoraron la degradación de la atrazina y el metalocloro, pero no de la trifluralina. En los dos primeros casos se aumentó la población de microorganismos del suelo, así como la actividad deshidrogenasa.

También restos vegetales procedentes de maíz fueron los que usaron Printz et al. (1995) para estudiar sus efectos en la degradación del metabenzotiazurón (MBT) en un luvisol órtico. La aplicación se realizó a un 1.5% (p/p). El tratamiento aumentó la disipación y mineralización del MBT, lo que corresponde con una mejora de la actividad microbiana.

Otros productos de origen vegetal derivados de la industria alimenticia pueden ser empleados en la biorremediación de suelos contaminados por plaguicidas. Uno de ellos es la okara, en el que se centra el presente trabajo, y sobre cuyas características se profundizará más adelante.

La okara es un subproducto de la elaboración de la leche de soja y de otros productos, como el tofu. En el procesado de esta bebida de origen vegetal, las habas son remojadas en agua durante entre 3 y 12 horas; la mezcla es molida y más agua es incorporada según la consistencia deseada del producto, normalmente en una proporción 1:10. El producto resultante, una especie de puré, es llevado a ebullición y filtrado. El resultado es la leche de soja y un subproducto filtrado insoluble, con un alto contenido en proteínas y fibra, que constituye la okara. Tradicionalmente, ha sido usado en la cocina asiática, especialmente en la japonesa, pero los usos potenciales de este subproducto son muchos y variados.

En general, 250 Kg de okara pueden ser extraídos por cada 1000 L del producto líquido previo a la obtención de leche de soja (Schved y Hassidov, 2010). El contenido en humedad puede ser de entre un 65% y un 80%. El contenido en proteína puede

variar dependiendo de la fuente, aunque el USDA proporciona los valores recogidos en la tabla 1.

TABLA 1: VALORES NUTRICIONALES DE LA OKARA POR 100 G DE PRODUCTO HÚMEDO (USDA, 2018).

Kcal	76,000	
Agua (g)	81,640	
Proteínas (g)	3,520	(19% en base seca)
Lípidos (g)	1,730	(9.50 % en base seca)
Carbohidratos (g)	12,230	
Fibra (g)	4,100	(22% en base seca)
Calcio (mg)	80,000	
Hierro (mg)	1,300	
Tiamina (mg)	0,020	
Riboflavina (mg)	0,020	
Niacina(mg)	0,100	
Vitamina B6 (mg)	0,115	

En el momento de la obtención, el contenido hídrico de la okara lo hace propenso a la degradación y debe ser procesado rápidamente, lo que limita su uso en alimentación humana (soy2020, 2005). En la actualidad, el uso más extendido de la okara es como alimento para ganado en granjas cercanas a las fuentes de producción. Si se pretende extender su uso en la industria alimentaria, deben implementarse medidas higiénicas a gran escala que estabilicen el producto y aumenten su tiempo de vida útil (Schved y Hassidov, 2010). La okara puede ser también utilizada para aumentar la fibra de alimentos pobres en fibra alimentaria (O'Toole, 1999). Además, puede ser procesada de numerosas formas, haciendo posibles resultados con distintas texturas, como polvos, copos, barras nutricionales similares a las de cereales, etc. Su alto contenido en lecitina, además, contribuye a sus propiedades emulgentes (Schved y Hassidov, 2010). Otros de los usos citados son como sustrato de fermentaciones en la fabricación de etanol o metano, como fertilizante o como componente de piensos de mascotas (soy2020, 2005).

Se estima que 14 millones de toneladas de okara son producidas cada año, de acuerdo a los datos que se tienen de consumo y producción de leche de soja (Choi et

al., 2015). La mayoría de estos residuos son compostados o usados en el sector agropecuario sin transformación previa, pero su alto contenido en nutrientes puede tener numerosas aplicaciones como ya se ha visto.

La fabricación de bioestimulantes a partir de okara se presenta, por tanto, como una alternativa sostenible para la reutilización y valorización de un producto de uso limitado. Tras la estabilización (reducción del contenido hídrico) de la okara para evitar su rápida degradación por parte de microorganismos, es posible su incorporación a distintos procesos con el fin de transformar la okara en un bioestimulante capaz de contribuir a la recuperación de suelos contaminados.

Hasta la fecha, solo se tiene una experiencia previa del uso de okara como bioestimulante. En el trabajo de Orts et al., (2017), fue usado en su forma pura y como bioestimulante fabricado por hidrólisis mediante la técnica pH-stat para la biodegradación del insecticida clorpirifós. Respecto a la aplicación de okara puro, este estimuló la actividad de los microorganismos del suelo y aceleró la degradación del insecticida en cuestión a lo largo de los 80 días que duró el experimento.

1.2.5. BIORREMEDIACIÓN CON PRODUCTOS ORGÁNICOS HIDROLIZADOS

Para que todos los compuestos orgánicos citados con anterioridad estimulen a los microorganismos del suelo y aceleren de esta forma el proceso de degradación de los plaguicidas, es necesario que dichos compuestos orgánicos se degraden hacia formas químicas más sencillas, fácilmente asimilables por los microorganismos. Esta degradación llevada a cabo por los microorganismos del suelo supone un importante gasto energético para dichos microorganismos (Gómez et al., 2014). Todo ello, es consecuencia de que dichas fuentes de materia orgánica están constituidas básicamente por proteínas de alto peso molecular, las cuales necesitan degradarse para ser aprovechadas por los microorganismos como fuente de energía.

En los últimos años, el interés en el uso de bioestimulantes obtenidos a partir de materia orgánica sometida a reacciones de hidrólisis utilizando diversas enzimas, principalmente proteasas, ha ido en aumento. Estos bioestimulantes se componen de cantidades variables de péptidos de bajo peso molecular, aminoácidos, polisacáridos, sustancias húmicas, fitohormonas, etc., (Colla et al., 2015; Halpern et al., 2015). Pueden ser absorbidos por microorganismos y plantas de forma rápida y directa, invirtiendo menos energía en el proceso. Así, la aplicación de estos bioestimulantes conlleva a un

aumento de la materia orgánica del suelo y macro- y micronutrientes, así como a una rápida activación de la microbiota del suelo (Gómez et al., 2014).

En la actualidad, son varios los bioestimulantes obtenidos a partir de procesos de hidrólisis enzimática utilizados en la biorremediación de suelos contaminados por plaguicidas. En este sentido, se han obtenido bioestimulantes a partir de lodos de depuradora, plumas de pollo, extracto de algarroba, salvado de arroz y okara utilizados en la biorremediación de suelos contaminados por los herbicidas MCPA y oxifluorfén, y el insecticida clorpirifós (Tejada et al., 2010a; Gómez et al., 2014; Rodríguez-Morgado et al., 2014; Orts et al., 2017).

Tras la aplicación de estos hidrolizados proteicos a los suelos contaminados por los plaguicidas citados, se observó una rápida estimulación de los microorganismos tolerantes a dichos plaguicidas. Esta rápida estimulación duró aproximadamente unas dos semanas tras su aplicación, debido al estar constituidos por péptidos de bajo peso molecular, estos fueron absorbidos rápidamente por los microorganismos. Como consecuencia, se observó una rápida disminución de la concentración del plaguicida en el suelo muy superior a la obtenida tras la aplicación de cualquier fuente de materia orgánica constituida por proteínas de alto peso molecular. Este hecho pone de manifiesto la importancia ecológica de estos compuestos orgánicos hidrolizados, punto de estudio de esa tesis doctoral.

1.3. ÍNDICES DE CALIDAD DEL SUELO

1.3.1. CONCEPTO

El suelo es un sistema complejo al que la humanidad da múltiples usos. Diferentes sectores, por tanto, tienden a definir la calidad del suelo en función de su uso particular. La definición más simple de la calidad de un suelo es “su capacidad para funcionar”. Una versión más amplia sería “la capacidad de un tipo específico de suelo para funcionar, dentro de un ecosistema natural o manejado, para mantener una producción vegetal o animal, o para mantener o mejorar la calidad del agua y aire, y mantener la salud y asentamiento humano” (Karlen et al., 1997).

Evaluar la capacidad de un suelo para sostener un cultivo fue, probablemente, la primera forma de medir la calidad del mismo. Calidad y cantidad de cultivos producidos actúan como factores cuantificables que relacionan la calidad del suelo con la salud humana (Warkentin, 1995). Otra forma de definir la calidad del suelo es de

acuerdo a la capacidad para realizar diversas funciones dentro del medio, como el reciclado de nutrientes, capacidad amortiguadora de cambios en el medio, etc. Hoy en día, medidas como la cantidad de biomasa, sus componentes o la actividad biológica (expresada mediante otros parámetros como la respiración, la actividad enzimática o la biodiversidad de microorganismos) son cada vez más importantes (Doran et al., 1994).

El concepto de calidad del suelo sigue siendo complejo e involucra muchas variables relacionadas entre sí. Una propuesta útil a la hora de trabajar con esta información es el establecimiento de un índice de calidad del suelo, que permita comparar diferentes suelos entre sí o si la calidad de un suelo va en aumento o decrece. Este índice debe ser capaz de integrar información física, química y biológica, así como tener la flexibilidad suficiente para ser aplicable distintas escalas espaciales y tipos de uso agrícola. Smith et al. (1993) propusieron un método que estima la calidad del suelo y que cumple aproximadamente con estos requisitos. Integra un número ilimitado de indicadores de calidad del suelo y transforma los datos en un resumen de acuerdo a unos criterios establecidos.

En la Conferencia Internacional para la Evaluación y Seguimiento de la Calidad del Suelo, llevada a cabo en el Instituto Rodale (Rodale Institute, 1991), se propone un índice de calidad del suelo integrando factores medioambientales, de productividad y de salud. Con posterioridad a dicha conferencia, el debate se mantuvo activo y muchos expertos propusieron métodos más elaborados y detallados, combinando e integrando determinados elementos de la calidad del suelo en índices más completos (Doran y Parkin, 1994; Karlen y Stott, 1994). Estas nuevas propuestas, además, permitían ajustar los índices a los objetivos del usuario.

El concepto de calidad del suelo y el desarrollo de índices para intentar cuantificarla sigue siendo ampliamente debatido. Algunos autores critican la falta de una definición clara, la dificultad para cuantificarlo y los errores cometidos a la hora de integrar funciones simultáneas, que suelen requerir de propiedades o indicadores contradictorios.

Independientemente de las propiedades o procesos a evaluar, los parámetros escogidos deben: influir la función evaluada, ser cuantificables y comparables frente a un estándar y ser capaces de detectar diferencias a nivel espacial y temporal (Karlen

et al., 1997). Estos parámetros se conocen como indicadores de calidad del suelo y pueden ser físicos, químicos o biológicos.

La tabla 2 muestra los distintos tipos de indicadores (físicos, químicos y biológicos) en el suelo, así como su relación con las funciones y condiciones del suelo.

En esta tesis doctoral se han hecho uso/estudio solo de los indicadores de tipo biológico, los cuales serán los que se describan más detalladamente a continuación.

TABLA 2: INDICADORES FÍSICOS, QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE LA CALIDAD DEL SUELO.

Indicadores	Relación con las funciones y condiciones del suelo
<u>FÍSICOS</u>	
Textura del suelo	Retención y transporte de agua y minerales, erosión del suelo.
Profundidad del suelo	Estimación del potencial productivo y de erosión.
Infiltración y densidad aparente	Potencial de lavado; productividad y erosividad.
Capacidad de retención de agua	Relación con la retención de agua, transporte, y erosividad; humedad aprovechable, textura y materia orgánica.
Estabilidad de los agregados	Erosión potencial de un suelo. Infiltración de agua.
<u>QUÍMICOS</u>	
Materia orgánica (C y N orgánico)	Define la fertilidad del suelo; estabilidad; erosión.
pH	Define la actividad química y biológica, límites para el crecimiento de plantas y actividad biológica.
Conductividad eléctrica	Define la actividad vegetal y microbiana, límites para el crecimiento de plantas y actividad biológica.
N, P y K extraíble	Nutrientes disponibles para la planta, pérdida potencial de N; productividad e indicadores de la calidad ambiental.
Capacidad de intercambio catiónico	Fertilidad del suelo, potencial productivo.
Metales pesados disponibles	Niveles de toxicidad para el crecimiento de la planta y la calidad del cultivo.
<u>BIOLÓGICOS</u>	
Biomasa microbiana (C y N)	Potencial catalizador microbiano y reposición de C y N.
N potencial mineralizable	Productividad del suelo y aporte potencial de N.
Respiración edáfica	Medición de la actividad microbiana.
Número de lombrices	Relacionado con la actividad microbiana.
Rendimiento del cultivo	Producción potencial del cultivo.

1.3.2. INDICADORES BIOLÓGICOS DE LA CALIDAD DEL SUELO

En los últimos años, el estudio y la investigación sobre la biología del suelo ha ido en aumento debido a la necesidad de conocer el papel fundamental que pueden ejercer los diversos organismos del suelo sobre las diferentes reacciones químicas que ocurren en dicho suelo.

De acuerdo con Karlen et al., (1997), los indicadores biológicos incluyen una gran variabilidad de parámetros que van a incidir directamente, tanto sobre la calidad del suelo, como la abundancia y subproductos de micro y macroorganismos, incluidos bacterias, hongos, nematodos, lombrices, anélidos y artrópodos. Incluyen funciones como la tasa de respiración, actividades enzimáticas, ergosterol y otros subproductos de los hongos, tasas de descomposición de los residuos vegetales, N y C de la biomasa microbiana.

Puesto que, en los últimos años, tanto el estudio de diversos parámetros bioquímicos, así como de la biodiversidad microbiana del suelo han tenido y aún sigue teniendo un gran peso específico sobre el estudio de la calidad del suelo, dentro de esta tesis doctoral se han estudiado ambos parámetros. Esto se debe principalmente a que estos parámetros biológicos, a diferencia de los físicos y químicos, responden mucho más rápido y a corto plazo tras la aplicación de cualquier producto al suelo o cualquier manejo al que se esté sometiendo dicho suelo (Andreoni et al., 2004; Zabaloy et al., 2008; Franco-Andreu et al., 2017). El hecho de que estos cambios ocurran mucho más rápidamente que los parámetros químicos y físicos se debe principalmente a que los microorganismos del suelo son muy sensibles a cualquier cambio, positivo o negativo.

1.3.2.1. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS COMO INDICADORES DE LA CALIDAD DEL SUELO

Las actividades de ciertas enzimas han sido utilizadas, en diversas combinaciones, para el desarrollo de índices de calidad bioquímica. Stefanic et al., (1984) propusieron el índice de actividad biológica, basado en una expresión que combina la actividad deshidrogenasa del suelo con la actividad catalasa. En el mismo año, Beck (1984) propuso el índice de número de enzimas, basado en la actividad de cinco enzimas diferentes. Por otro lado, Perucci, (1992) propone el coeficiente de hidrolizado, calculado a partir de la cantidad de acetato de fluoresceína hidrolizado por el suelo. Una de las ventajas de evaluar las distintas actividades enzimáticas en lugar de la

biomasa microbiana, es que estos métodos se centran en la fracción activa (Blagodatskaya y Kuzyakov, 2013).

El uso de las actividades enzimáticas tiene su base teórica en que estas:

- están estrechamente relacionadas con otros indicadores de la calidad del suelo como el contenido en materia orgánica, la biomasa, o la actividad microbiana.
- responden más rápidamente a estímulos que otros factores.
- pueden constituir un índice biológico e integrativo que informe sobre las prácticas llevadas a cabo sobre el suelo.
- pueden ser relativamente fáciles de medir y, por tanto, tienen potencial para llevarse a cabo de forma rutinaria.

La extracción de las enzimas del suelo es costosa y puede conllevar la desnaturalización de estas, así que son determinadas mediante la medida de la actividad enzimática en una serie de condiciones ideales (temperatura, pH y concentración de sustrato). Así, en realidad cuando se habla de actividad enzimática se mide la actividad enzimática potencial y no la actividad *in situ*. La actividad enzimática ha demostrado ser capaz de discernir entre diversas prácticas agrícolas, pero los resultados pueden variar en función de la actividad elegida y el suelo analizado. Determinar el objetivo a evaluar debe ser prioritario para elegir correctamente las actividades enzimáticas a analizar, así como los indicadores complementarios (Doran et al., 1996; Tabatabai, 2003).

Según su función, las enzimas del suelo más estudiadas son las oxidorreductasas (en particular, deshidrogenasas y catalasas) y las hidrolasas, que son enzimas relacionadas con el ciclo del C, N, P y S, dentro de las cuales, destacamos β -glucosidasas, proteasas, ureasa, fosfatasas, y arilsulfatasas. En consecuencia, existe una fuerte correlación entre la actividad bioquímica de los microorganismos de un suelo con la calidad de dicho suelo. En la tabla 3 se muestran algunas de las actividades enzimáticas más estudiadas.

1.3.2.2. BIODIVERSIDAD MICROBIANA COMO INDICADOR DE LA CALIDAD DEL SUELO

La biodiversidad de los microorganismos del suelo suele ser pasada por alto en beneficio de la de organismos de mayor tamaño, ignorando por completo su potencial como indicador de calidad. Evaluarla directamente, además, puede resultar difícil debido a impedimentos taxonómicos y metodológicos. Una alternativa es examinar los

componentes de la biodiversidad para detectar patrones biológicamente significativos, como la biodiversidad funcional (Zak et al., 1994).

TABLA 3: FUNCIONES DE ALGUNAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DEL SUELO.

Hidrolasas:

- **Invertasa:** Sacarosa → glucosa + fructosa.
- **Celulasa:** celulosa (cristalina) → celulosa (amorfa) → celobiosa.
- **β-Glucosidasa:** celobiosa → glucosa + ROH.
- **Fosfomonoesterasa:** Fósforo orgánico → Fósforo inorgánico.
- **Ureasa:** Urea → CO₂ + NH₄⁺.
- **Proteasa:** Proteínas y péptidos → NH₄.
- **Arilsulfatasa:** Azufre orgánico → Azufre inorgánico.

Oxidoreductasas:

- **Deshidrogenasa:** XH₂ + A → X + AH₂.
 - **Fenol oxidasas:** monofenol + ½ O₂ → Quinona + H₂O.
 - **Lacasa:** 4(difenol) + O₂ → 4(quinona) + 2H₂O.
 - **Peroxidasa:** donador e⁻ + H₂O₂ → donador oxid. + H₂O.
 - **Catalasa:** 2H₂O₂ → 2H₂O + O₂.
-

La heterogeneidad y diversidad procariótica es difícil, si no imposible, de medir de forma directa. Suele ser expresada en función de diversidad de capacidades biológicas, no en diversidad de morfologías. Una aproximación para resolver este tema es estudiar la morfología de las colonias que muestras de suelo puedan formar en placas de un medio nutritivo. Sin embargo, esta metodología asume que los microorganismos formadores de colonias son representativos de la microbiota total del suelo y existe evidencia que apunta a lo contrario (Pillai et al., 1991; Doran et al., 1996; Torsvik et al., 2002). Por tanto, existen cada vez más alternativas bioquímicas para suplir estos defectos metodológicos.

Uno de ellos es el análisis de fosfolípidos de membrana (PLFA). Esta metodología ha sido usada para estimar el tamaño de las poblaciones microbianas residentes en suelos desde la subsuperficie hasta profundidades de 200 cm. El método consiste en la extracción de los fosfolípidos de las membranas de los microorganismos usando disolventes orgánicos. Ya que no hay una fase de enriquecimiento, el análisis

de PLFA es un indicador directo de la estructura de las poblaciones microbianas. Este método tiene como ventaja que informa sobre el tamaño de la población, así como de la composición de la misma, ya que los PLFA extraídos pueden ser caracterizados en función de la cantidad y tipo (Findlay et al., 1989; Zelles et al., 1992; Doran et al., 1996).

Además de estos métodos, existen otra serie de procedimientos de carácter molecular en continuo crecimiento y expansión. Algunos de ellos son la reasociación de ADN, la hibridación de ADN-ADN y mARN:ADN, amplificación y secuenciación de ADN, así como otros métodos basados también en el uso de la PCR, como electroforesis en gel desnaturizante, por gradiente de temperatura, análisis de espaciadores intergénicos ribosomales (RISA) y análisis de espaciadores intergénicos ribosomales automático (ARISA) (Kirk et al., 2004). El problema de los métodos basados en PCR es que están sesgados, al estar limitados por el diseño previo de cebadores. Nuevos métodos independientes de secuencias conocidas ya han sido desarrollados y probados con éxito (Stokes et al., 2001).

La metagenómica del suelo permite identificar y caracterizar los genes de una muestra e informa sobre las vías metabólicas activas, los elementos regulatorios, genes de patogénesis, de virulencia, etc. Los actuales retos de la genómica del suelo consisten en extraer información funcional de estos datos, es decir, saber qué vías y genes se están expresando y cuáles de estos son claves en los procesos biogeoquímicos, así como relacionar filogenia y función o, dicho de otro modo, adscribir funciones microbiológicas a microorganismos en concreto (Torsvik et al., 2002). Estudios metagenómicos han demostrado ser capaces de mostrar diferencias a nivel de comunidad, distinguiendo entre diversas prácticas agrícolas (Souza et al., 2013).

2. OBJETIVOS

En la última década, el diseño y desarrollo de nuevos bioestimulantes fabricados mediante procesos de hidrólisis enzimática de subproductos agroindustriales con fines biorremediadores de suelos contaminados por plaguicidas está alcanzando un gran interés dentro de la comunidad científica.

En esta línea, la okara es un subproducto obtenido de la fabricación de leche de soja, tofu y derivados, rica en fibra dietética y proteínas, que contiene aminoácidos esenciales. Este alto contenido proteico lo hace un buen candidato para originar nuevos bioestimulantes que sean de utilidad en la recuperación de suelos contaminados por plaguicidas.

En consecuencia, se pueden definir y establecer dos objetivos claramente diferenciados durante el desarrollo de este trabajo de tesis:

Objetivo 1

Desarrollo de nuevos bioestimulantes a partir de okara mediante el uso de distintas enzimas. En este sentido, se diseñarán y crearán dos tipos de hidrolizados proteicos:

1. Hidrolizado proteico en el que se hace uso de una sola enzima. En este caso, se usará la endoproteasa subtilisina.
2. Hidrolizados proteico en el que se hace uso de dos enzimas. En primer lugar, se hará uso de la subtilisina y, a continuación, se hará uso de la exoproteasa flavourzyme.

Ambos bioestimulantes se desarrollarán a nivel de laboratorio, utilizando para ello un biorreactor. Se caracterizarán ambos productos desde un punto de vista químico.

Objetivo 2

Una vez desarrollados los bioestimulantes propuestos en el objetivo 1, se estudiará la eficacia de estos en la biorremediación de suelos contaminados por tres herbicidas de toxicidad en suelo documentada. Para ello, se contaminará un suelo con dichos herbicidas y posteriormente se añadirán los bioestimulantes, comprobando su repercusión sobre diferentes propiedades biológicas del suelo, tales como el estudio de diferentes actividades enzimáticas (actividades deshidrogenasa, ureasa, β -glucosidasa y fosfatasa) y el análisis de la biodiversidad microbiana del suelo mediante el estudio de los ácidos grasos de membrana (PLFAs).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CARACTERÍSTICAS DEL SUELO, LA OKARA Y LOS HERBICIDAS

3.1.1. CARACTERÍSTICAS DEL SUELO

El suelo utilizado en los distintos experimentos que engloba esta memoria fue un Regosol calcárico (FAO, 1989). Dicho suelo se sitúa en las inmediaciones de Montequinto, perteneciente al término de Dos Hermanas (Sevilla). Las muestras de suelo fueron recolectadas de los primeros 25 cm del horizonte superficial (Ap). Una vez trasladado al laboratorio, se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se tamizó con un tamiz de luz de malla de 2 mm. Por último, las muestras se guardaron en botes de plástico hasta su análisis físico-químico. Las características físico-químicas de este suelo se recogen en la tabla 4.

TABLA 4: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO EXPERIMENTAL (MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR, N = 3).

pH (H ₂ O)	7,7 \pm 0,1
Arena gruesa (g kg ⁻¹)	480 \pm 38
Arena fina (g kg ⁻¹)	132 \pm 21
Limo (g kg ⁻¹)	127 \pm 32
Arcilla (g kg ⁻¹)	261 \pm 33
N-Kjeldahl (g kg ⁻¹)	0,91 \pm 0,07
Materia orgánica (g kg ⁻¹)	16,7 \pm 1,2
C ácidos húmicos (mg kg ⁻¹)	3148 \pm 44
C ácidos fúlvicos (mg kg ⁻¹)	2875 \pm 36
C orgánico soluble en agua (μ g C g ⁻¹)	483 \pm 8
P (g kg ⁻¹)	12,7 \pm 1,4
K (g kg ⁻¹)	22,8 \pm 1,9
Fe (g kg ⁻¹)	11,8 \pm 2,1
Cu (g kg ⁻¹)	8,7 \pm 1,1
Mn (g kg ⁻¹)	9,2 \pm 1,7
Zn (g kg ⁻¹)	5,7 \pm 1,3
Cd (g kg ⁻¹)	4,0 \pm 0,8
Pb (g kg ⁻¹)	2,0 \pm 0,6
Ni (g kg ⁻¹)	2,1 \pm 0,4
Cr (g kg ⁻¹)	1,1 \pm 0,2

3.1.2. CARACTERÍSTICAS DE LA OKARA

La okara pura de la que se partió para la fabricación de los nuevos bioestimulantes fue proporcionada por la empresa Soria Natural S.A. La tabla 5 muestra las características químicas de dicho subproducto orgánico.

TABLA 5: COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DISTRIBUCIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA PROTEÍNA (Da) (MEDIA ± ERROR ESTÁNDAR, N = 3) EN EL OKARA UTILIZADO EN LA FABRICACIÓN DE BIOESTIMULANTES.

Materia orgánica (g kg ⁻¹)	540 ± 19
Grasa (g kg ⁻¹)	236 ± 22
Carbohidratos (g kg ⁻¹)	295 ± 14
Proteína (g kg ⁻¹)	349 ± 12
N (g kg ⁻¹)	61,1 ± 2,2
P (g kg ⁻¹)	6,6 ± 1,4
K (g kg ⁻¹)	9,4 ± 1,0
S (g kg ⁻¹)	4,0 ± 1,3
Ca (g kg ⁻¹)	1,6 ± 0,3
Mg (g kg ⁻¹)	2,2 ± 0,7
Fe (g kg ⁻¹)	63,6 ± 5,1
Cu (g kg ⁻¹)	10,7 ± 1,1
Mn (g kg ⁻¹)	31,0 ± 2,4
Zn (g kg ⁻¹)	27,8 ± 2,4
<i>Distribución del peso molecular de las proteínas (Da)</i>	
> 10000	90,7 ± 3,4
10000 – 5000	1,3 ± 0,4
5000 – 1000	1,6 ± 0,3
1000 – 300	0,5 ± 0,1
< 300	5,9 ± 1,6

3.1.3. HERBICIDAS EMPLEADOS

Para estudiar el efecto biorremediador de los nuevos bioestimulantes a partir de okara, se usaron 3 tipos de herbicidas diferentes actuaron como agentes contaminantes del suelo. Los tres herbicidas utilizados fueron oxifluorfén, imazamox y diurón.

3.1.3.1. OXIFLUORFÉN

En el caso del oxifluorfén (figura 3), para este trabajo, se utilizó la formulación comercial Fenfen (24% p v⁻¹, 240 g L⁻¹) de Lainco, S.A. (España). Este producto se presenta con un aspecto de líquido rojizo, de densidad similar a la del agua (0,94 – 1,04 g/L⁻¹) y emulsionable en la misma.

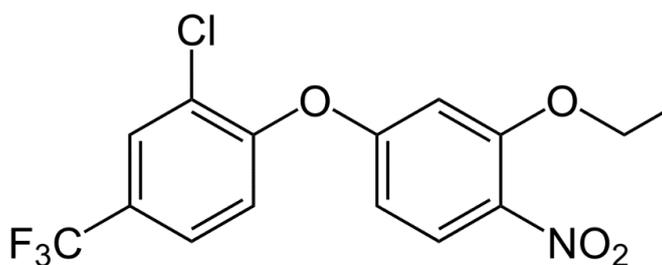


FIGURA 3: ESTRUCTURA DEL HERBICIDA OXIFLUORFÉN.

El oxifluorfén [2-cloro-1-(3-etoxi-4-nitrofenoxi)-4-(trifluorometil)benceno] (C₁₅H₁₁ClF₃NO₄) es un herbicida perteneciente a la familia de los difeniléteres, con actividad herbicida residual y de contacto, selectivo, absorbido más fácilmente por las hojas, especialmente por los brotes, que por las raíces, con muy poca traslocación. Se define como únicamente de contacto sin efecto sistémico. Es utilizado en una gran cantidad de cultivos, tales como algodón, cítricos, hortalizas, etc. En nuestra región es muy utilizado también en el cultivo del olivo para la obtención de aceite de oliva.

Es un producto que provoca la destrucción de las membranas celulares de las paredes vegetales con las que entra en contacto, produciendo necrosis. Tiene uso como plaguicida de preemergencia y de postemergencia. Las manchas amarillas que deja sobre las plántulas son características y, pese su baja solubilidad y baja volatilidad, puede presentar problemas por transferencia en cultivos sensibles, especialmente cultivos de hoja, como de la espinaca o la lechuga (Phytoma, 2018). Su medio de acción es la inducción de la formación de radicales libres vía inhibición de la protoporfirinógeno oxidasa (Vencill, 2002). Por esta problemática, su uso cuenta con importantes regulaciones en Europa.

Este herbicida está Incluido en el Anexo I según el Reglamento de Ejecución (UE) nº 798/2011 de la Comisión de 9 de agosto de 2011 [DO L 205 de 10.08.2011] (Reglamento de Ejecución (UE) 2017/359 de la Comisión de 28 de febrero de 2017 por el que se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) nº 540/2011 en lo relativo a las

condiciones de aprobación de la sustancia activa). Este reglamento limita el uso del oxifluorfén como herbicida para pulverización en bandas en cercanía al suelo, desde el otoño hasta principios de primavera, en cantidades que superen los 150 g de sustancia activa por hectárea y año.

En Estados Unidos, se estima que el uso del oxifluorfén alcanzó la media anual de $3,45 \cdot 10^6$ Kg, en una superficie de $4,7 \cdot 10^6$ Ha, entre 1990 y 1999, observándose, además, una tendencia al alza. Entre 1992 y 1997 el aumento del uso del herbicida fue del 54%. En términos de cantidades empleadas, estimados a partir de las compras del ingrediente activo, los cultivos de mayor importancia fueron la uva para vino (32%), las almendras (23%) y, en menor medida, el algodón (7%), las nueces (6%) y la uva de mesa (4%).

En otros países, como La India, ha sido recientemente registrado como herbicida de uso en preemergencia, especialmente en cultivos de arroz, vid y cebolla, en los que tanto su eficacia como su persistencia han sido demostradas ampliamente (Janaki et al., 2013). En China, es común su uso en maíz, algodón y plantas bulbosas como cebolla, ajo y puerro (Zhang, 2003; Wu et al., 2013).

Sobre la salud humana, este herbicida es de baja toxicidad oral, dermal e inhalatoria. Los efectos principales son alteraciones en los parámetros de la sangre, como anemia, y en el hígado. De acuerdo a estudios de carcinogénesis en ratones, el oxifluorfén está clasificado como posiblemente carcinogénico al estar relacionado con la aparición de carcinomas y adenomas hepatocelulares. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) ha calificado al oxifluorfén como de preocupación menor respecto a sus efectos crónicos (cancerígenos o no) por exposición alimentaria, aunque alerta de la necesidad de actualizar sus estándares en cuanto a las cantidades de oxifluorfén permitidas en ciertos productos, como algodón, soja forrajera, heno, etc. (EPA, 2002).

Más preocupante es la exposición ocupacional de los trabajadores que usen el herbicida como forma de control de malas hierbas, así como la de personas que usen el oxifluorfén en sus residencias. La EPA informa de una reducción de hasta cien veces del riesgo de sufrir cáncer por exposición cuando la aplicación se hace de una forma adecuada y con las medidas protectoras adecuadas (EPA, 2002).

Respecto al medioambiente, el oxifluorfén puede afectar en gran medida a ecosistemas acuáticos y terrestres a todos los niveles: es tóxico para la vida vegetal,

invertebrados, peces y anfibios; asimismo, puede producir efectos crónicos y subcrónicos sobre mamíferos y aves. Sin embargo, se informa de la escasa o nula toxicidad sobre mamíferos, aves y abejas ante exposiciones agudas (EPA, 2002).

3.1.3.2. IMAZAMOX

Para la segunda experiencia de incubación, el herbicida empleado fue el imazamox (figura 4). El producto comercial empleado fue Imazamox Pulsar® 40 (4% imazamox), proporcionado por BASF Agricultural Solutions España. Se presentan como un concentrado denso de color blanco y soluble en agua.

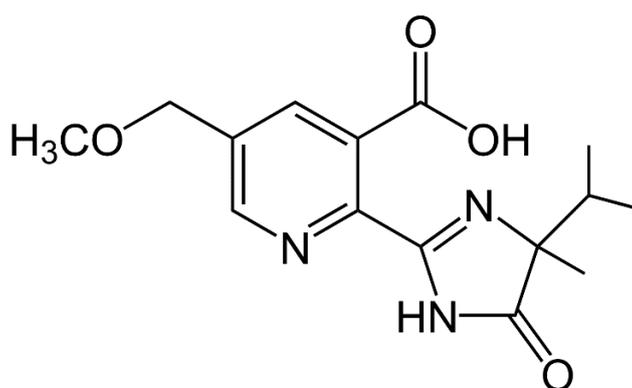


FIGURA 4: ESTRUCTURA DEL HERBICIDA IMAZAMOX

El imazamox [ácido (RS)-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metoximetilnicotínico], $C_{15}H_{19}N_3O_4$, es un herbicida perteneciente a la familia de las imidazolinonas, sistémico selectivo postemergente, con acción residual. Es un producto de amplio espectro contra gramíneas y dicotiledóneas y de uso habitual en cultivos de soja, trigo, girasol, arroz, maíz, canola, etc. (Shaner, 2014; Cassino et al., 2017). El sitio de acción del imazamox es la acetohidroxiácido sintasa, enzima que cataliza la primera etapa de la síntesis de aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) (Scarponi et al., 2001).

Las imidazolinonas, en general, son compuestos inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) cuya estructura molecular consta de un anillo imidazol con un grupo metilo, además de una segunda estructura cíclica que generalmente se trata de un anillo aromático carboxilado. En el caso concreto del imazamox, este es un anillo pirimidínico (Duggleby et al., 2008; Pfenning y Se, 2008).

Su situación en el registro de la UE es la siguiente: Incluido en el Anexo I según la Directiva 2003/23/CE de la Comisión de 25 de marzo de 2003 [DO L 81 de 28.03.2003]. Reglamento de Ejecución (UE) n° 540/2011 de la Comisión de 25 de mayo de 2011, por el que se aplica el Reglamento (CE) n° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la lista de sustancias activas autorizadas. Reglamento (UE) n° 823/2012 de la Comisión de 14 de septiembre de 2012 por el que se establece una excepción al Reglamento de Ejecución (UE) n° 540/2011 en lo referente a la fecha de expiración de la aprobación de la sustancia activa. Reglamento de Ejecución (UE) 2016/950 de la Comisión de 15 de junio de 2016, por el que se modifica el Reglamento (UE) n° 540/2011 en lo que respecta a la prórroga del periodo de aprobación de la sustancia activa. Reglamento de Ejecución (UE) 2017/841 de la Comisión de 17 de mayo de 2017 que modifica el Reglamento de Ejecución (UE) n° 540/2011 en lo que respecta a la ampliación del periodo de aprobación de la sustancia activa.

El imazamox muestra baja toxicidad en algas y ninguna en aves, peces e invertebrados acuáticos, cuando se usa en los rangos establecidos por los fabricantes y por las instituciones pertinentes. Por el contrario, muestra una toxicidad elevada en plantas acuáticas. Evitar la contaminación de corrientes de agua cercanas es, por tanto, crucial para evitar la degradación de estos componentes del ecosistema. Además, el imazamox puede resultar tóxico sobre la vegetación nativa de los lugares cercanos a la aplicación, por lo que medidas típicas de prevención deben ser aplicadas (como evitar su aplicación en días de viento, en los que la dispersión puede resultar más elevada) (APVMA, 2000). Los productos derivados de su degradación no presentan actividad herbicida y tienen baja movilidad en suelo, lo cual es positivo desde un punto de vista ambiental (Shaner y O'Connor, 2017).

Es un herbicida de uso común en La India, en combinación con otras imidazolinonas, sobre cultivos de soja para combatir especies de malas hierbas como *Echinochloa sp.*, *Dinebra arabica*, *Digitaria sp.*, *Brachiaria mutica*, *Commelina benghalensis* o *Euphorbia hirta* (Choudhury et al., 2016). También está registrado para su uso en el control de malas hierbas en Norte América y Europa, en cultivos de trigo, colza, girasol, arroz y maíz (Penning y Se, 2008).

3.1.3.3. DIURÓN

Por último, en la tercera experiencia de incubación se empleó el herbicida diurón (figura 6). El compuesto utilizado se corresponde con la formulación comercial Diurokey 80% (p/p) de Industrial Química Key, S.A. (España). Se presenta como un polvo mojable de color blanquecino.

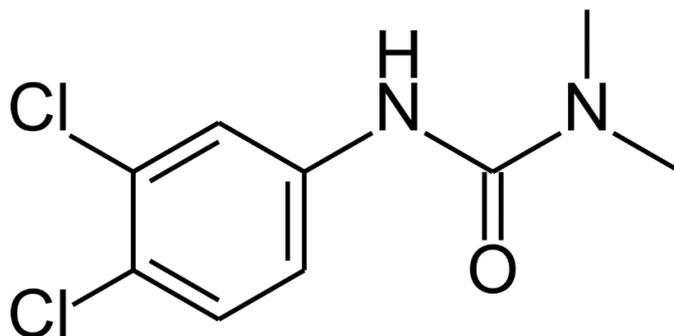


FIGURA 5: ESTRUCTURA DEL HERBICIDA DIURÓN.

El diurón (nombre comercial), o DCMU, [3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea] ($C_9H_{10}Cl_2N_2O$) (figura 5) es una urea sustituida usada en el control de malas hierbas en pre- y postemergencia en el cultivo de caña de azúcar, maíz, algodón, alfalfa, cítricos, espárragos, frutales de pepita u olivo, entre otros. También se usa en otras áreas como jardines, vías de tren y caminos.

Su acción como herbicida fue descrita en 1951 y fue comercializado por primera vez por Bayer en 1954 (Malato et al., 2003). Gran parte de la problemática derivada de su uso tiene que ver con su elevada persistencia en suelo. Este herbicida inhibe la fotosíntesis mediante el bloqueo de la transferencia de electrones en el fotosistema II y la producción de oxígeno, tanto en plantas como en microorganismos fotosintéticos (Bonnet et al., 2007). La interrupción del flujo electrónico se da por bloqueo de los sitios de unión de la plastoquinona (en el PS II) y tiene como resultado la reducción de la habilidad de las plantas para transformar la energía lumínica en energía química en forma de ATP y potencial reductor (Metz et al., 1986).

El diurón está registrado en la Unión Europea y regulado por el Reglamento de Ejecución (UE) nº 540/2011 de la Comisión de 25 de mayo de 2011, por el que se aplica el Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la lista de sustancias activas autorizadas. Esta aprobación termina el 30 de

septiembre de 2019 (mediante prórroga) y, tras esta fecha, será reevaluado. Se encuentra en el Plan de acción móvil comunitario (Community Rolling Action Plan, CoRAP), lo que significa que su regulación y uso será evaluada en los próximos años. Está permitido en Italia y Eslovaquia, y en regulación en Austria, República Checa, Grecia, España, Irlanda y Reino Unido (European Commission, 2018).

El reglamento citado estipula que solo se podrán autorizar los usos del herbicida en cantidades no superiores a $0,5 \text{ kg ha}^{-1}$. Además, el reglamento hace especial énfasis en la necesidad de la seguridad del operario aplicante y en la necesidad de un equipo de protección individual, así como en la protección de los organismos acuáticos y de las plantas no objetivo.

Debido a su peligrosidad y persistencia, tanto en suelo como en agua, ha sido incluido en la lista de sustancias tóxicas prioritarias de la Comisión Europea de Recursos de Agua Dulce. Además, a nivel internacional, se encuentra en la tercera lista de contaminantes prioritarios de aguas para consumo humano presentada por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos.

3.2. PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA LA OBTENCIÓN DE LOS BIOESTIMULANTES

El proceso de hidrólisis tuvo lugar en un biorreactor mediante el método pH-stat (Adler-Nissen, 1979). De este proceso, que se detalla a continuación, se obtuvieron dos nuevos bioestimulantes a partir de la okara anteriormente comentado denominados como OB y OF.

A la hora de fabricar dichos bioestimulantes, hay que tener en consideración que la okara se recibió en laboratorio con una humedad reducida para aumentar su estabilidad como producto de consumo. Si se emplease dicho producto con ese nivel de humedad, surgirían problemas a la hora de realizar el proceso bioquímico de hidrólisis, ya que las enzimas utilizadas en el proceso no realizarían sus funciones en óptimas condiciones y, en consecuencia, no habría una buena solubilización del producto. Para evitar esta problemática, se secó y rehidrató la okara hasta obtener un producto con un porcentaje final de materia seca del 10%.

Para obtener el primer bioestimulante (OB), se usó la enzima subtilisina. Esta enzima es una endoproteasa que rompe las proteínas internamente, generando péptidos de diverso tamaño molecular, pero raramente aminoácidos libres. La

subtilisina se obtuvo mediante fermentación líquida con *Bacillus licheniformis* ATCC® 21415™ (Romero et al., 2007).

La hidrólisis se llevó a cabo a una temperatura de 55 °C, con un 0.3% de enzima y en condiciones constantes de pH ajustando con KOH (pH = 9). La hidrólisis duró 2 h, pero se permitió que el proceso durase 20 h para asegurar que se llevara a cabo por completo.

Después de este proceso, el producto se centrifugó 30 minutos a 8000 x g y 4 °C para retirar la fracción sólida. La fracción líquida, la de interés, se concentró a 80 °C y presión de vacío mediante rotavapor. A esta temperatura, la enzima es inactivada, eliminando la actividad residual que pueda tener. La figura 6 muestra un resumen esquemático del proceso hidrolítico descrito.

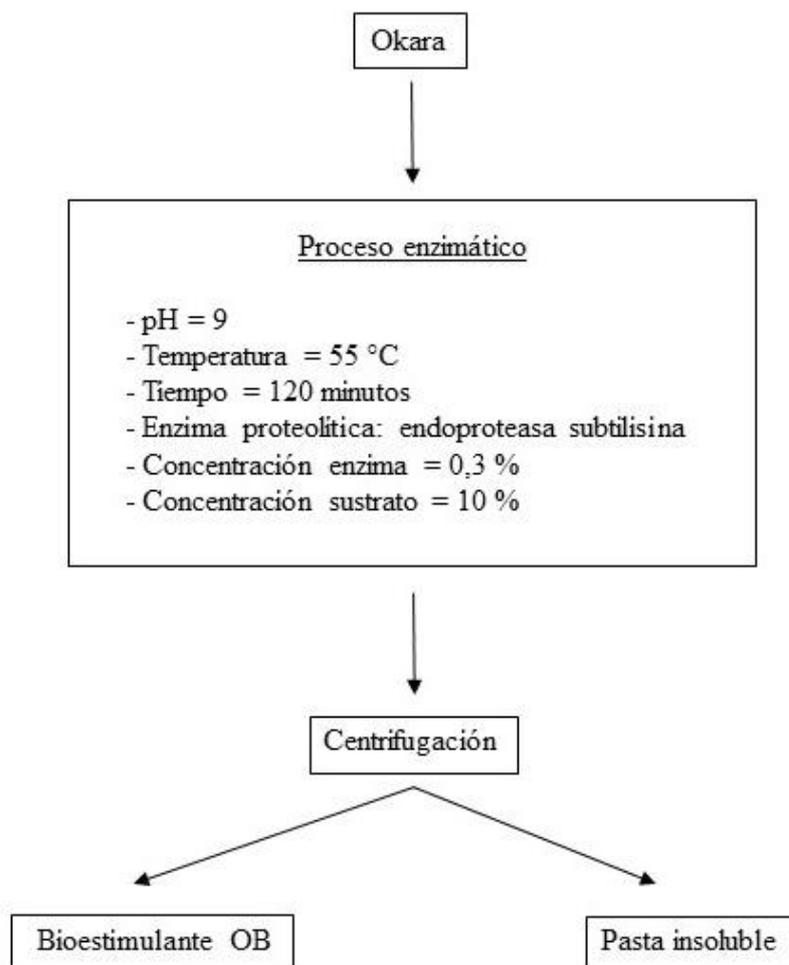


FIGURA 6: OBTENCIÓN DEL BIOESTIMULANTE OB.

Para la fabricación del segundo bioestimulante (OF), se partió del producto que se obtuvo de la primera hidrólisis (antes de que tuviese lugar su centrifugación y concentración). Este producto se calentó 20 minutos a 80 °C para inactivar la primera enzima (subtilisina) e impedir que esta actuase sobre la segunda.

A continuación, se inició el segundo proceso enzimático, llevando el producto a una temperatura de 55 °C, en pH constante ajustando con KOH (pH = 6.5) y con una concentración de enzima del 0,3%. Esta segunda enzima, flavourzyme®, es una exoproteasa que corta las cadenas peptídicas en el extremo N'-terminal, generando un gran número de aminoácidos libres. Fue provista por Beerzymes.dk. El proceso duró 2 h, pero, de nuevo, se permitió que durase 20 h. Después de esto, el producto fue centrifugado y concentrado en las mismas condiciones que el anterior. Un resumen de este proceso puede observarse en la figura 7.

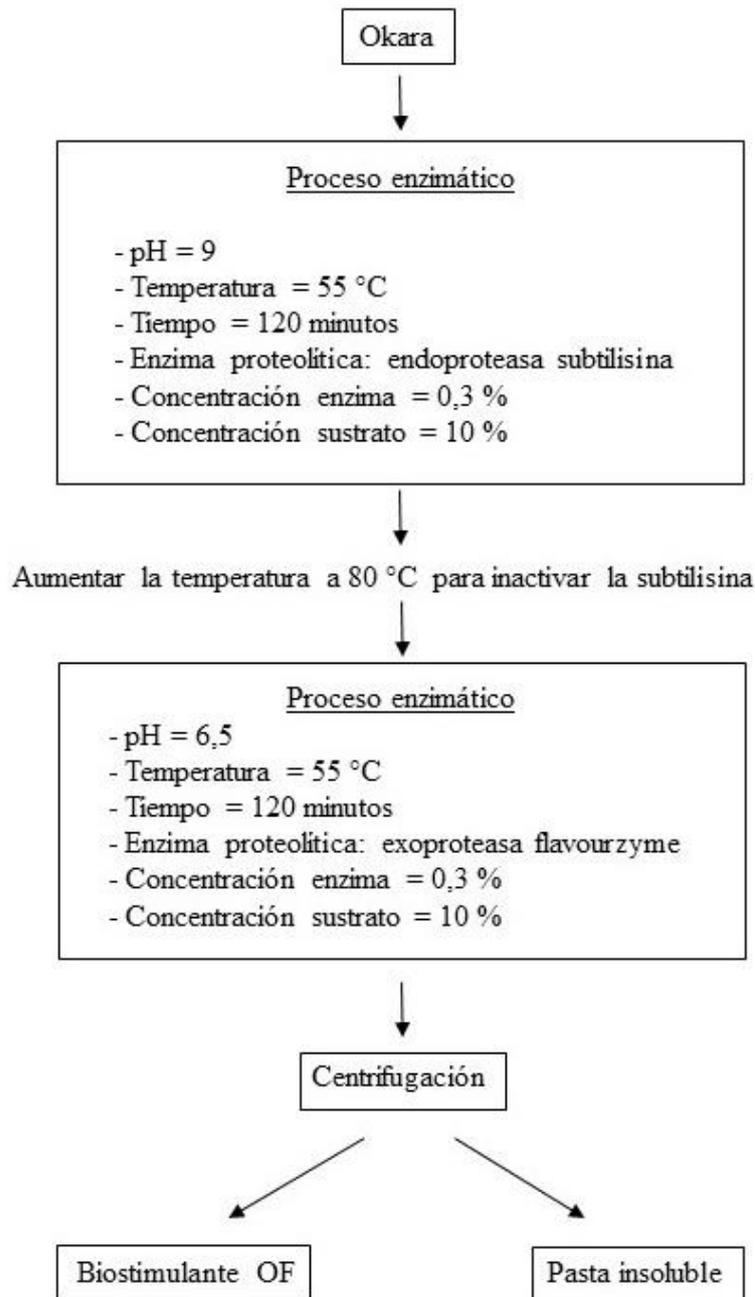


FIGURA 7: OBTENCIÓN DEL BIOESTIMULANTE OF.

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para alcanzar el segundo objetivo descrito con anterioridad, se realizaron diversas experiencias de incubación. En ellas, se emplearon tanto los tres herbicidas descritos como los nuevos bioestimulantes experimentales. Por ello, a partir de ahora hablaremos de primera experiencia de incubación, segunda experiencia de incubación y tercera experiencia de incubación.

3.3.1. PRIMERA EXPERIENCIA DE INCUBACIÓN

El objetivo de esta primera experiencia fue estudiar la capacidad de biorremediación de los nuevos bioestimulantes en suelos contaminados por el herbicida oxifluorfén. Dicho estudio se realizó en el laboratorio (microcosmos), utilizando para ello botes de cristal con una capacidad de 0,5 L donde se introdujeron 300 g del suelo experimental (seco a temperatura ambiente y tamizado con tamiz de 2 mm de luz de malla). Hay que destacar que, en este tipo de experimentos de contaminación de suelos con compuestos orgánicos, es aconsejable el uso de recipientes de cristal para que el contaminante no se adhiera a las paredes del recipiente y altere los datos de forma artificial.

En la naturaleza existe una gran variabilidad de factores y resulta difícil determinar las relaciones causa-efecto. En otras palabras, es complicado asignar las variaciones a un factor concreto cuando existen muchos y cuando estos pueden interactuar entre sí. Extraer el suelo del medio y aislarlo en contenedores idénticos, permite, en gran medida igualar y controlar numerosas variables. Los estudios en microcosmos se presentan como una alternativa a los estudios de toxicidad sobre especies concretas, pues estos integran las interrelaciones que se producen en la naturaleza, así como los efectos sinérgicos o compensatorios que pueden darse en presencia de ciertos compuestos naturales u otros contaminantes presentes (Sánchez Gimeno et al., 1987).

Los contenedores fueron contaminados con la dosis de oxifluorfén recomendada por el fabricante (4 L ha^{-1}). Las muestras de suelo se mezclaron con los bioestimulantes OB y OF a una dosis de materia orgánica de 3% para OB y 3% para OF, con el objetivo de aplicar la misma dosis al suelo ($20 \text{ Tm de materia orgánica ha}^{-1}$). Con este fin, se aplicaron 5 g de bioestimulante OB a cada microcosmos, y 4,2 del bioestimulante OF a los microcosmos correspondientes.

Ambos bioestimulantes se solubilizaron en agua destilada antes de la aplicación y añadieron al suelo. Del mismo modo, se usó un suelo no enmendado orgánicamente y no contaminado con oxifluorfén como control. Se agregó agua destilada a cada suelo para llevarla al 60% de su capacidad de retención de agua. Los tratamientos de incubación se detallan a continuación:

- 1) S, suelo no enmendado orgánicamente y no contaminado con oxifluorfén.

- 2) S+OB, suelo enmendado con el bioestimulante OB y no contaminado con oxifluorfén.
- 3) S+OF, suelo enmendado con el bioestimulante OF y no contaminado con oxifluorfén.
- 4) S+Ox, suelo no enmendado orgánicamente y contaminado con oxifluorfén.
- 5) S+Ox+OB, suelo enmendado con el bioestimulante OB y contaminado con oxifluorfén.
- 6) S+Ox+OF, suelo enmendado con el bioestimulante OF y contaminado con oxifluorfén.

Cada tratamiento se realizó por triplicado (18 contenedores en total). Dichos contenedores se colocaron de forma aleatoria en una cámara de incubación con temperatura controlada (25 ± 1 °C). El contenido de humedad se controló gravimétricamente y la pérdida de humedad se reemplazó por agua destilada según sea necesario.

El periodo de incubación fue de 90 días. Durante dicho periodo se cogieron 15 gramos de suelo para realizar los pertinentes análisis, excepto para los días 10 y 90, en los que se recogieron 30 gramos de suelo. Las muestras se guardaron en congelador a -20 °C hasta su análisis. De cada tratamiento fertilizante, se realizó un muestreo a los 5, 10, 20, 35, 55 y 90 de haber iniciado dicho experimento.

En dichas muestras se realizaron las siguientes determinaciones analíticas:

- 1) Propiedades bioquímicas: determinación de distintas actividades enzimáticas (deshidrogenasa, ureasa, β -glucosidasa y fosfatasa alcalina). Dichas determinaciones se realizaron a los 5, 10, 20, 35, 55 y 90 de haber iniciado el experimento.
- 2) Biomasa de la comunidad microbiana del suelo, mediante el análisis de los ácidos grasos de membrana (PLFAs). Dichas determinaciones se realizaron a los 10 y 90 días de haber iniciado el experimento, para bacterias Gram⁻, Gram⁺, totales y hongos.
- 3) Determinación de la concentración de oxifluorfén en suelo a los 5, 10, 20, 35, 55 y 90 días de haber iniciado el experimento.

3.3.2. SEGUNDA EXPERIENCIA DE INCUBACIÓN

El objetivo de esta segunda experiencia fue estudiar la capacidad de biorremediación de los nuevos bioestimulantes experimentales en suelos contaminados por el herbicida imazamox, también en laboratorio (condiciones de microcosmos).

Los contenedores fueron contaminados con una dosis de imazamox de 2,5 L ha⁻¹, siendo utilizadas en este caso las mismas dosis de los bioestimulantes experimentales expuestas en la primera experiencia de incubación. Los tratamientos para esta segunda experiencia se detallan a continuación:

- 1) S, suelo no enmendado orgánicamente y no contaminado con imazamox.
- 2) S+OB, suelo enmendado con el bioestimulante OB y no contaminado con imazamox.
- 3) S+OF, suelo enmendado con el bioestimulante OF y no contaminado con imazamox.
- 4) S+I, suelo no enmendado orgánicamente y contaminado con imazamox.
- 5) S+I+OB, suelo enmendado con el bioestimulante OB y contaminado con imazamox.
- 6) S+I+OF, suelo enmendado con el bioestimulante OF y contaminado con imazamox.

En este caso, también cada tratamiento se realizó por triplicado (18 contenedores en total). Del mismo modo, los contenedores se colocaron de forma aleatoria en una cámara de incubación con temperatura controlada (25 ± 1 °C). El contenido de humedad se controló gravimétricamente y la pérdida de humedad se reemplazó por agua destilada según fuese necesario.

El periodo de incubación fue también de 90 días. Durante dicho periodo se cogieron 15 gramos de suelo para realizar los pertinentes análisis, excepto para los días 10 y 90, en los que se recogieron 30 gramos de suelo. Las muestras se guardaron en congelador a -20 °C hasta su análisis. De cada tratamiento fertilizante, se realizó un muestreo a los 5, 10, 20, 35, 55 y 90 de haber iniciado dicho experimento.

En dichas muestras se realizaron las siguientes determinaciones analíticas:

- 1) Propiedades bioquímicas: determinación de las actividades enzimáticas (deshidrogenasa, ureasa, β-glucosidasa y fosfatasa alcalina). Dichas

determinaciones se realizaron a los 5, 10, 20, 35, 55 y 90 de haber iniciado el experimento.

- 2) Biodiversidad de la comunidad microbiana del suelo, mediante el análisis de los ácidos grasos de membrana (PLFAs). Estas determinaciones se realizaron a los 10 y 90 días de haber iniciado el experimento.
- 3) Determinación de la concentración de imazamox en suelo a los 5, 10, 20, 35, 55 y 90 días de haber iniciado el experimento.

3.3.3. TERCERA EXPERIENCIA DE INCUBACIÓN

Esta tercera y última experiencia se realizó, también en ensayos en microcosmos, con el objetivo de estudiar la capacidad de biorremediación de los nuevos bioestimulantes experimentales en suelos contaminados por el herbicida diurón a una dosis de 2 Kg ha⁻¹.

Las condiciones de incubación, así como las dosis de bioestimulantes empleados, también fueron las mismas que en los casos anteriores: Para este experimento, los tratamientos de incubación se detallan a continuación:

- 1) S, suelo no enmendado orgánicamente y no contaminado con diurón.
- 2) S+OB, suelo enmendado con el bioestimulante OB y no contaminado con diurón.
- 3) S+OF, suelo enmendado con el bioestimulante OF y no contaminado con diurón.
- 4) S+D, suelo no enmendado orgánicamente y contaminado con diurón.
- 5) S+D+OB, suelo enmendado con el bioestimulante OB y contaminado con diurón.
- 6) S+D+OF, suelo enmendado con el bioestimulante OF y contaminado con diurón.

También, el periodo de incubación fue de 90 días. Durante dicho periodo se cogieron 15 gramos de suelo para realizar los pertinentes análisis, excepto para los días 10 y 90, en los que se recogieron 30 gramos de suelo. Las muestras se guardaron en congelador a -20°C hasta su análisis. En este sentido, se muestreó cada tratamiento fertilizante a los 5, 10, 20, 35, 55 y 90 de haber iniciado el experimento.

En dichas muestras se realizaron las siguientes determinaciones analíticas:

- 1) Propiedades bioquímicas: determinación de las actividades enzimáticas (deshidrogenasa, ureasa, β -glucosidasa y fosfatasa alcalina). Dichas determinaciones también se realizaron a los 5, 10, 20, 35, 55 y 90 de haber iniciado el experimento.

- 2) Biodiversidad de la comunidad microbiana del suelo, mediante el análisis de los ácidos grasos de membrana (PLFAs). También se realizaron a los 10 y 90 días de haber iniciado el experimento.
- 3) Determinación de la concentración de diurón en suelo a los 5, 10, 20, 35, 55 y 90 días de haber iniciado el experimento.

3.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

A continuación, se detallan las determinaciones realizadas en suelos y residuos orgánicos.

3.4.1. DETERMINACIONES ANALÍTICAS EN SUELO

3.4.1.1. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOS

I. DETERMINACIÓN DE LA TEXTURA

Se determinó según el método descrito por Bascomb y Avery, (1982). El procedimiento seguido es el siguiente:

A una muestra de suelo en baño de arena se le añaden cantidades sucesivas de agua oxigenada (30%) hasta completa destrucción de materia orgánica. Posteriormente, se añaden cantidades sucesivas de ácido clorhídrico 0,1 M con el objetivo de destruir los carbonatos que tenga el suelo.

Se toman 30 g de suelo y se mezclan 300 mL de agua destilada y 15 mL de hexametáfosfato sódico. Posteriormente, se agita la muestra en un agitador rotatorio y se pasa el contenido a una probeta de 1.000 mL, utilizando para ello un tamiz de malla de 0,063 mm, que permite separar la fracción arena de la de limos y arcillas.

Las arenas se llevan a una cápsula de porcelana que se introduce en una estufa a una temperatura de 105 °C. Una vez secadas, se tamizan con un tamiz de luz de malla de 0,1 mm, con el objetivo de separar arena fina de arena gruesa. Posteriormente y por diferencia de pesadas se calcula el porcentaje de ambas fracciones.

En la probeta enrasada se extraen mediante la pipeta de Robinson las fracciones de limos y arcillas de acuerdo a los tiempos internacionalmente admitidos y teniendo en cuenta la temperatura. Ambas extracciones por separado se llevan a sendas cápsulas de porcelana en las que, previo secado en estufa, se determina el peso de la arcilla y limos de la muestra.

3.4.1.2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICOS

I. DETERMINACIÓN DE PH

La determinación de pH se realizó siguiendo el método descrito en el Manual de Métodos Oficiales de Análisis (MAPA, 1994) Para ello, la determinación se hizo en agua siguiendo una proporción 1/2,5 (p/v). Tras la adición de agua, la muestra de suelo se agita durante 10 minutos y posteriormente se deja reposar 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se determina el pH en pH-metro.

II. DETERMINACIÓN DEL N-KJELDHAL

La determinación del N-Kjeldahl se realizó siguiendo el método descrito en el Manual de Métodos Oficiales de Análisis (MAPA, 1994). El método consiste en convertir las distintas formas de nitrógeno del suelo en NH_4^+ , que servirá para determinar el contenido en nitrógeno de la muestra. Para ello, se sigue el método de Kjeldahl, consistente en una digestión ácida y posterior arrastre por vapor del amoníaco desprendido en medio alcalino.

El procedimiento es el siguiente: se pesan 5 g de suelo y se colocan en un tubo de digestión junto con 20 mL de H_2SO_4 concentrado y una cucharadita de una mezcla formada por sulfato de cobre, sulfato de potasio y selenio, catalizadores de la reacción de digestión (la reacción de digestión se lleva a cabo a una temperatura de 360 °C, durante 2,5 h, en un sistema digestor conectado a un extractor de gases). A continuación, se deja enfriar el tubo el tiempo necesario y se añade agua destilada con precaución (aproximadamente 75 mL). Se filtra y enrasa en un matraz aforado de 100 mL. La destilación de la muestra se realiza sobre una alícuota (10 mL), añadiendo sosa concentrada hasta la aparición de color negro; con ello, se desplaza el amoníaco y se recoge por arrastre en 25 ml de H_2SO_4 (N/10) y unas gotas de indicador mixto. Finalmente, se valora el H_2SO_4 (N/10) con NaOH (N/10). Por otro lado, se trabaja del mismo modo con una muestra en blanco, sin presencia de suelo.

El contenido en nitrógeno de la muestra se expresa en porcentaje, teniendo en cuenta que 1 ml de H_2SO_4 (N/10) corresponde a 1.4 mg de nitrógeno.

- Cantidad de nitrógeno (mg) en la alícuota (Nal):

$$Nal = (B - M) \text{ mL } H_2SO_4 \times f \times 1.4 \text{ mg N mL}^{-1} H_2SO_4$$

- Cantidad de nitrógeno (g) en la muestra (Nm):

$$Nm = Nal \text{ mg} \times 10 \times 10^{-3} \text{ g/mg}$$

- Proporción de nitrógeno en el suelo:

$$\% N = \frac{Nm}{P} \times 100$$

donde:

- P = peso de suelo empleado en la muestra (g)
- B = volumen de NaOH empleado en la valoración del blanco (mL).
- M = volumen de sosa empleado en la valoración de la muestra (mL).
- $(B - M)$ = volumen de ácido sulfúrico neutralizado en la valoración (mL).
- F = factor de pureza de la sosa.

III. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE C ORGÁNICO TOTAL

Se determinó según el método descrito por Yeomans y Bremner (1988). Este consiste en una oxidación del carbono orgánico con dicromato potásico en medio ácido, y una valoración posterior del exceso de dicromato con sal de Mohr.

Para ello, se pesan entre 0,1 y 0,5 g de muestra, y se añaden 5 mL de dicromato potásico 1N y 7,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se colocan en la estufa a 170 °C durante media hora y, una vez frío, se añaden 5 ml de ácido fosfórico concentrado, H_3PO_4 , y agua destilada hasta un volumen de 50 mL, aproximadamente. A continuación, se valora el exceso de dicromato con sal de Mohr 0,5 N en presencia del indicador. El punto final es el cambio de color de azul a verde. Paralelamente, se preparan blancos en frío y en caliente (media hora en estufa a 170 °C).

El porcentaje de carbono orgánico total oxidable (COT) se obtiene según la siguiente fórmula:

$$\% COT = \frac{(A) \times (N \text{ sal de Mohr}) \times 0,003}{\text{g de muestra}} \times 100$$

donde:

- $A = [(BC - S) \times (BF - BC) / BF] + (BC - S)$
- BC = mL de sal de Mohr gastados por el blanco caliente.
- BF = mL de sal de Mohr gastados por el blanco frío.
- S = mL de sal de Mohr gastados por la muestra.
- N = normalidad de sal de Mohr.

Para suelos, el contenido de materia orgánica se calcula multiplicando el contenido de carbono orgánico total del suelo por el factor 1,724 (Magdoff et al., 1996).

IV. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE C-ÁCIDOS HÚMICOS Y FÚLVICOS

Las sustancias húmicas se obtuvieron mediante un procedimiento convencional (Kononova, 1961; Schnitzer, 1982) basado en la extracción alcalina con pirofosfato sódico, acidificación, separación de ácidos húmicos y fúlvicos basándose en su diferente solubilidad a distintos valores de pH, eliminación de impurezas y liofilización.

La presencia de carbonatos en el suelo se eliminó por agitación mecánica de la muestra de suelo durante 30 minutos con ácido fosfórico 2 M, repitiendo tres veces este tratamiento. Después se lavaron las muestras de suelo con agua destilada hasta que la suspensión alcanzó pH 7. Seguidamente, se realizó una extracción con pirofosfato sódico, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 0.1 M (pH 9.8) en la proporción 1:10 (suelo:extractante) y, posteriormente, con hidróxido sódico 0.1 M a temperatura ambiente. Cada extracción se repitió tres veces, agitando mecánicamente durante 3 horas, centrifugando a 15.300 x g durante 15 minutos y filtrando el sobrenadante a través de un papel de filtro de 0,2 μm . Los extractos alcalinos se unieron y se acidificaron con ácido clorhídrico hasta pH 1, dejándolos en nevera durante 24 horas para permitir la precipitación completa de los ácidos húmicos, los cuales se separaron del sobrenadante (conteniendo los ácidos fúlvicos) mediante centrifugación a 30.100 x g durante 15 minutos.

Los ácidos húmicos obtenidos se purificaron, disolviéndolos en NaOH 0,1 M, centrifugando a 30.100 x g y desechando el residuo. El sobrenadante se acidificó con HCl concentrado hasta pH 1. La suspensión se dejó en reposo durante 12 horas a temperatura ambiente y después se centrifugó a 30.100 x g durante 15 minutos. Los ácidos húmicos precipitados se lavaron con agua destilada, se dializaron y finalmente se liofilizaron.

La purificación de los ácidos fúlvicos se llevó a cabo pasando el filtrado ácido a través de una columna de resina XAD-8. Los ácidos fúlvicos fijados por adsorción se recuperaron eluyendo con NaOH 0,1 M. Los cationes se eliminaron haciendo a los ácidos fúlvicos pasar por una resina de intercambio iónico Amberlyst 15. Finalmente, se liofilizó el producto.

El C de los ácidos húmicos y fúlvicos se determina por el método de Yeomans y Bremner (1988), descrito con anterioridad.

V. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE C SOLUBLE EN AGUA

El C soluble en agua se extrajo con agua destilada siguiendo una relación 1:10 p/v a 50 °C y en agitación durante 1 h, seguido por centrifugación a 15.000 x g durante 15 minutos (García et al., 1990).

En el extracto, el C fue determinado por el método de oxidación de dicromato, anteriormente descrito (Yeomans y Bremner, 1988).

VI. DETERMINACIÓN DEL P ASIMILABLE

Para la concentración de P asimilable, se siguió el método de Willians y Stewart descrito por Guitián y Carballas (1976), basado en una determinación colorimétrica en la que se mide la densidad óptica de una disolución de color azul producida al reducir el complejo fosfomolibdico formado por reacción entre el ácido ortofosfórico, H_3PO_4 , y el ácido molibdico, $MoO_3 \cdot H_2O$. Se calcula la concentración de P por la proporción existente entre la intensidad de color y la cantidad de ortofosfato presente.

Para ello, se emplean 2 g de suelo y se le añaden 100 mL de disolución extractora (compuesta por carbonato cálcico, $CaCO_3$, carbonato magnésico, $MgCO_3$, ácido sulfúrico, H_2SO_4 , y agua destilada a pH 3,2-3,3): Después de agitar durante cinco minutos, se filtra y se procede a la determinación del fósforo.

Se toman 50 mL del filtrado, se diluyen hasta un volumen de aproximadamente 80 mL con agua destilada y se le añaden 4 mL de la disolución de molibdato amónico (2,5 g de molibdato amónico disueltos en 100 mL de ácido sulfúrico 10 N), se lleva a 90-95 mL con agua destilada y se añaden 0,8 mL de disolución de cloruro de estaño (II) (1 g de cloruro de estaño (II) disuelto en 100 mL de ácido clorhídrico al 10%), enrasando a 100 mL y agitando posteriormente. Se mantiene 30 minutos en la oscuridad, al cabo de este tiempo se mide la densidad óptica en un espectrofotómetro a 690 nm.

La concentración de P en la disolución se obtiene por comparación con la curva patrón obtenida a partir de soluciones de P de concentración conocida.

VII. DETERMINACIÓN DEL K ASIMILABLE

Se ha seguido el método descrito por Guitián y Carballas, (1976), basado en la extracción de dicho elemento con acetato amónico, y la posterior determinación en el extracto. Para ello se introducen 5 g de muestra seca en un bote de agitación con 50 mL

de solución extractora de acetato amónico. Se agita la muestra durante 30 minutos y a continuación se filtra en un frasco de polietileno. El potasio se determina por fotometría de emisión de llama, construyendo una curva patrón a partir de disoluciones de concentración conocida.

VIII. DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS TOTALES

Para la determinación de los metales pesados totales, las muestras de suelo y materia orgánica han de ser digeridas previamente. La muestra se debe mineralizar por vía húmeda en microondas. Para ello, se sitúa en el interior de un vaso de teflón de alta presión seco. El peso de muestra a tomar debe ser de $0,4-0,5 \pm 0,0005$ g. Se añaden los reactivos de digestión, 1 mL de H_2O_2 y 4 mL HNO_3 , y se introduce en el microondas durante un determinado período de tiempo. Este mineralizado, una vez frío, se introduce en un matraz aforado de 25 ml donde se enrasa a dicho volumen, y se guarda en botella de poliestireno para su almacenamiento en nevera y posterior análisis. A partir del extracto obtenido se determinaron los metales pesados por espectrometría de absorción atómica Pelkin-Elmer 5500.

El cálculo de las concentraciones en metales pesados de las muestras se hace mediante la utilización de patrones de concentración conocida, utilizando HNO_3 diluido.

3.4.1.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOLÓGICOS

I. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DESHIDROGENASA

La actividad deshidrogenasa del suelo se determinó siguiendo el método descrito por Trevors et al. (1982) y modificado por García et al. (1993), basado en la estimación del iodonitrotetrazolio formazán (INTF) formado por reducción cuando el suelo es incubado con 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT) como aceptor de electrones, en ausencia de tampón.

Para ello, a un gramo de muestra tamizada a 2 mm se le añaden 0,4 mL de agua destilada y 0,2 mL de INT (al 0,4 % peso:volumen). A continuación, se deja incubar a 20 °C en completa oscuridad durante 20 horas. Posteriormente, se adicionan 10 mL de metanol, CH_3OH , y se agita vigorosamente durante 2 minutos; a continuación, se filtra. Paralelamente, se preparan controles sin INT, en los que a 1 g de suelo se le añade 0,6 mL de agua. El extracto se lee en espectrofotómetro a 490 nm.

La densidad óptica relativa del instrumento es transformada en concentración mediante una recta patrón obtenida con INTF (iodonitrofenil formazano) en distintas concentraciones. La actividad de la muestra se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$ADH = \frac{(C \times V)}{(Pm \times G \times T)}$$

donde:

- ADH = actividad deshidrogenasa ($\mu\text{moles INTF formado g}^{-1}\text{h}^{-1}$).
- C = cantidad de INTF de la muestra, en $\mu\text{g ml}^{-1}$.
- Pm = peso molecular del INTF ($471,3 \text{ g mol}^{-1}$).
- V = factor de dilución.
- G = factor referente al peso del suelo seco.
- T = factor de tiempo de incubación; en este caso 20 horas.

II. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA UREASA

La actividad ureasa del suelo se determinó siguiendo el método descrito por Kandeler y Gerber (1988), basado en la determinación del amonio liberado en la incubación de una solución de suelo a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas. La determinación del amonio se realiza a través de la reacción de Berthelot. En este método, el amonio producido por la actividad ureasa reacciona con salicilato y dicloro-isocianuro, generando un color verde azulado. La absorbancia a 690 nm es directamente proporcional a la concentración de nitrógeno amoniacal.

Para ello, a 1 g de muestra de suelo se añaden $0,5 \text{ mL}$ de urea $0,48 \%$ y 4 mL de tampón borato $\text{pH } 10$. Paralelamente se prepara para cada muestra un control con 1 g de suelo y 4 mL de tampón borato $\text{pH } 10$. Además, se prepara un blanco conteniendo $0,5 \text{ mL}$ urea $0,48 \%$ y 4 mL de tampón borato $\text{pH } 10$. Muestra, control y blanco, se incuban en baño termostático con agitación a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas. Terminado este período se añaden $0,5 \text{ mL}$ de urea $0,48 \%$ al control.

A continuación, en ambos casos, se extrae el amonio liberado utilizando 6 mL $\text{KCl } 7,4 \%$, agitando durante 30 minutos. Seguidamente, se centrifuga y filtra la suspensión de suelo. El resultado es un filtrado de extracto claro en el que se determina amonio por colorimetría como a se detalla continuación.

Para determinar el amonio, a 0,5 mL de extracto se adicionan en el siguiente orden: 4,5 mL de agua destilada, 2,5 mL de salicilato de Na/NaOH y 1 mL de dicloroisocainuro de sodio, y la mezcla se deja reposar 30 minutos en oscuridad. La absorbancia se mide en espectrofotómetro, después de haber ajustado el equipo a cero con el blanco, a una longitud de onda de 690 nm.

La densidad óptica relativa medida se transforma en concentración mediante una recta patrón obtenida con concentraciones conocidas de amonio. Las unidades propuestas para esta actividad enzimática son $\mu\text{moles de N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ suelo seco h}^{-1}$. La actividad de la muestra se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$AU = \frac{(S - B) \times V}{(Pm \times G \times T)}$$

donde:

- AU = actividad ureasa ($\mu\text{moles de N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ suelo seco h}^{-1}$).
- S = cantidad de N-NH₄⁺ en las muestras ($\mu\text{g de N-N H}_4^+$) obtenida de la curva patrón.
- B = cantidad de N-NH₄⁺ ($\mu\text{g de N-N H}_4^+$) para los blancos.
- Pm = peso atómico del nitrógeno (14 g mol^{-1}).
- V = volumen total del extracto de incubación.
- G = factor relativo a la cantidad suelo seco usado.
- T = factor de tiempo de incubación (horas).

III. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA B-GLUCOSIDASA

El método utilizado toma como referencia el descrito por Tabatabai (1982) y Eivazi y Tabatabai, (1988), basado en la determinación colorimétrica del p-nitrofenol obtenido por la acción de la β -glucosidasa después de incubar el suelo con el sustrato artificial p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (PNG) en medio tamponado a pH 6 y a temperatura de 37 °C, y posterior extracción del p-nitrofenol liberado por filtración después de la adición de CaCl₂ y tampón THAM pH 12, que en medio básico desarrolla un color amarillo.

Para ello, a 0,5 g de muestra de suelo se le añaden 0,5 mL de sustrato PNG 0,025 M y 2 mL de tampón MUB-HCl de pH 6. Paralelamente, se prepara para cada muestra un control con 0,5 g de suelo y 2 mL de tampón. Se prepara un blanco conteniendo 0,5

mL de sustrato y 2 mL de tampón. Muestra, control y blanco, se incuban en baño termostático con agitación a 37 °C durante 1 hora. Terminado este período se añaden 0,5 mL de sustrato a los controles.

A continuación, todos los tubos se enfrían a 4 °C en baño con hielo durante 15 minutos, para frenar la reacción enzimática. Pasado este tiempo, se adicionan a todos los tubos, muestra, control y blanco, 0,5 mL de CaCl₂ 0,5 M y 2 mL de disolución THAM-NaOH 0,1 M, pH 12. Se agita bien para que la suspensión se mezcle completamente. Seguidamente se centrifugan los tubos a 3.000 rpm durante 10 minutos. Se diluye convenientemente el sobrenadante y se mide su absorbancia en el espectrofotómetro, después de haber ajustado el equipo a cero con el blanco, a una longitud de onda de 400 nm. El CaCl₂ se añade para bloquear la reacción y para provocar la floculación de coloides que podrían interferir en la lectura espectrofotométrica, y la disolución THAM-NaOH sirve para salificar el producto de reacción obtenido dándole color amarillo.

La densidad óptica relativa medida se transforma en concentración mediante una recta patrón obtenida con concentraciones conocidas de PNF. Las unidades propuestas para expresar esta actividad enzimática son $\mu\text{moles PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$. La actividad β -glucosidasa se calcula usando la siguiente ecuación:

$$AG = \frac{(C \times V)}{(Pm \times G \times T)}$$

donde:

- AG = actividad β -glucosidasa $\mu\text{mol PNF g}^{-1}\text{suelo seco h}^{-1}$
- C = concentración de PNF (μg) en el extracto, según la recta de calibración obtenida.
- V = factor de dilución.
- Pm = peso molecular del p-nitrofenol (139 g mol^{-1}).
- G = factor referente al peso del suelo seco.
- T = factor relativo al tiempo de incubación, en horas.

IV. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA FOSFATASA

Esta actividad enzimática se determinó por el método descrito por Tabatabai y Bremner (1969), basado en la determinación espectrofotométrica del p-nitrofenol liberado cuando se incuba el suelo a 37 °C con una disolución tamponada (pH 11,5 para la alcalina) del substrato artificial p-nitrofenil-fosfato (PNF). El método colorimétrico para medir el p-nitrofenol liberado se basa en el hecho de que las disoluciones alcalinas de este compuesto tienen color amarillo.

Para ello, a 0,5 g de muestra de suelo se le añaden 0,5 mL de p-nitrofenil fosfato 0,025 M y 2 mL de tampón MUB pH 11,5. Paralelamente se prepara para cada muestra un control con 0,5 g de suelo y 2 mL de tampón MUB pH 11,5. Además, se prepara un blanco con 0,5 mL de sustrato y 2 mL de tampón MUB pH 11,5. Muestra, control y blanco, se incuban en baño termostático con agitación a 37 °C durante 1 hora. Terminado este período se añaden 0,5 mL de sustrato a los controles.

A continuación, todos los tubos se enfrían a 4 °C durante 15 minutos, para frenar la reacción enzimática. Pasado este tiempo, se adicionan a todos los tubos, muestra, control y blanco, 0,5 mL de CaCl₂ 0,5 M y 2 mL de NaOH 0,5 M. Se agita bien para que la suspensión se mezcle completamente. Seguidamente se centrifugan los tubos a 3.400 rpm durante 10 minutos. Se diluye convenientemente el sobrenadante y se mide su absorbancia, en el espectrofotómetro, después de haber ajustado el equipo a cero con el blanco, a una longitud de onda de 400 nm.

La densidad óptica medida se transforma en concentración mediante una recta patrón obtenida con concentraciones conocidas de p-nitrofenol-fosfato. Las unidades propuestas para expresar esta actividad enzimática son $\mu\text{moles p-nitrofenol liberado g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La actividad fosfatasa se calcula usando la siguiente expresión:

$$AP = \frac{(C \times V)}{(Pm \times G \times T)}$$

donde:

- AP = actividad fosfatasa ($\mu\text{moles p-nitrofenol liberado g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
- C = cantidad p-nitrofenol de la muestra en μg .
- V = factor de dilución.
- Pm = peso molecular del p-nitrofenol (139 g mol^{-1}).

- G = factor relativo al peso del suelo seco utilizado.
- T = factor relativo al tiempo de incubación en horas.

V. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA

Para la medición de los ácidos grasos de fosfolípidos de membrana (PLFAs) se siguió la metodología recogida en Schutter y Dick (2000). Previamente a la extracción, todo el material empleado debe lavarse dos veces con cloroformo. 3 g de suelo se introducen en tubos de centrífuga de 50 mL de capacidad. A estos, se les adicionan 30 µL del estándar interno 21:0 (3-metil-heneicosano), 15 mL de solución alcalina de KOH 0,2M en metanol y se agitan las muestras 30 segundos en vórtex. Se introducen las muestras en un baño a 37 °C sin agitación. Durante esta incubación, las muestras han de agitarse en vórtex durante 5 segundos cada 10 minutos.

Transcurrido ese tiempo, se añaden 3 mL de ácido acético 1 M para neutralizar el pH del contenido de los tubos y se agitan en vórtex 5 segundos. A continuación, se añaden 10 mL de hexano (o iso-octano) y se agitan en vórtex 30 segundos. Se procede a centrifugar los tubos a 2.200 rpm durante 10 minutos. Los ácidos grasos quedarán en la fase orgánica (superior).

Esta fase se traslada a tubos de vidrio de 10 mL, que son secados en centrífuga de vacío a 1.000 rpm y 40 °C hasta completar la evaporación del disolvente. Después, la muestra se redisuelve en 50 µL de iso-octano y se trasvasa al inserto en un vial de 2 mL. Para la determinación por cromatografía, el concentrado disuelto en iso-octano y los patrones cromatográficos, también disueltos en iso-octano, se trasladan al cromatógrafo. Este es un sistema Perkin Elmer Autosystem XL, que utiliza una columna de diámetro interno 0,2 mm. El gas portador es He a 250 kPa y la secuencia de temperaturas la que se especifica a continuación: de 70 °C hasta 160 °C durante 2 minutos a una velocidad de 30 °C min⁻¹, aumento a 280 °C a una velocidad de 3 °C min⁻¹, mantenimiento del flujo durante 15 minutos.

El cálculo para la concentración de cada PLFA se realiza mediante la siguiente fórmula:

- Para el blanco:

$$C = \frac{(F_{FM} \times C_{IS} \times 1000)}{(P \times F_{IS} \times MG_{FM})}$$

- Para cada muestra:

$$C = \frac{(F_{FM} \times C_{IS} \times 1000)}{(C_{BW} \times F_{IS} \times MG_{FM})} \times \frac{100}{P}$$

donde:

- C = Concentración nmol g⁻¹.
- F_{FM} = área del pico en la muestra.
- MG_{FM} = peso molecular del ácido correspondiente con el pico.
- C_{IS} = concentración del estándar interno expresada en µg.
- F_{IS} = área del pico correspondiente al patrón estándar interno.
- P = peso del suelo.
- 1000 = factor de conversión a nmol.
- C_{BW} = concentración del PLFA en el blanco calculado por la primera fórmula.

Para calcular la diversidad de PLFAs mediante el índice de Shannon, HPLFA, se utiliza la siguiente expresión:

$$HPLFA = - \sum_{n=1}^{\infty} pi \ln pi$$

donde:

- pi: es la abundancia relativa de cada ácido graso con respecto a la suma total.
- n: es el número total de ácidos grasos detectados.

V.I. NOMENCLATURA, CLASIFICACIÓN DE PLFAs Y DIVERSIDAD

La nomenclatura de los PLFA se designa atendiendo al esquema X:Y:Z, donde X se refiere al número de átomos de carbono, Y al número de dobles enlaces, y Z indica la posición del primer doble enlace desde el extremo alifático de la molécula. El símbolo ω expresa la posición del primer doble enlace desde el extremo metilo de la molécula. Los prefijos iso (*i*) y anteiso (*a*) indican ramificación en los átomos de C número 2 y 3, respectivamente. El prefijo cy indica presencia de un grupo ciclopropilo. La configuración cis o trans se expresa mediante los prefijos c o t respectivamente.

Los ácidos grasos i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1ω7c, 17:0, i17:0, cy17:0, 18:1ω9c, y cy19:0 representan biomasa bacteriana (Frostegård et al., 1993; Bardgett

et al., 1996; Dungait et al., 2011) mientras que el ácido graso 18:2 ω 6 es exclusivo de hongos (Federle et al., 1986; Zelles et al., 1992; Bååth, 2003). Los ácidos grasos específicos de bacterias Gram positivas son los siguientes: i15:0, a15:0, i16:0, y i17:0; y los correspondientes a Gram negativas son cy17:0, 18:1 ω 9c, y cy19:0.

3.4.1.4. DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS EN SUELO

I. DETERMINACIÓN DE OXIFLUORFÉN EN SUELO

La extracción de oxifluorfén se realizó siguiendo la metodología descrita por Anastassiades y Lehotay (2003). Para ello, se utilizó una mezcla de trifenilfosfato y acetonitrilo para agitar el suelo. Una vez agitado y centrifugado, al sobrenadante se le añadió sulfato magnésico, se volvió a agitar y centrifugar. El sobrenadante se concentró y se recompuso el residuo seco con 1 mL de ciclohexano:acetato de etilo 9:1.

El oxifluorfén se determinó mediante un espectrómetro de masas en tándem e impacto electrónico, donde las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Gas portador: He a 1 mL min⁻¹; Temperatura inicial inyector: 70 °C durante 0,50 min, 310 °C a 100 °C/min durante 10 min; Columna: 30 mm x 0,25 mm ID; Temperatura inicial del horno de columna: 70 °C durante 3,5 min., 180 °C a 35 °C/min, 300 °C a 10 °C/min durante 5 min; Temperaturas del detector: Trampa a 250 °C, Colector a 60 °C, Xferline hasta 280 °C; Volumen de inyección: 5 μ l.

II. DETERMINACIÓN DE IMAZAMOX EN SUELO

La determinación del herbicida imazamox se realizó mediante un espectrómetro de masas y uno de impacto electrones en tándem. Se siguió la metodología recogida en Liu et al., (2016). El herbicida se extrajo usando diclorometano y su medida se realizó mediante HPLC en un sistema Quattro micro API (Waters, EE.UU.). La separación tuvo lugar en una columna Inertsil ODS-3 C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m) a 30 °C usando metanol y ácido acético (7:3) como fase móvil y una un flujo de 0,8 mL min⁻¹. Los parámetros de la espectrometría de masas fueron los siguientes: ionización electrospray (ESI), modo de ionización positiva, flujo del gas de cono de 80 L h⁻¹, flujo del gas de solvatación de 600 L h⁻¹, temperatura fuente de 120 °C, temperatura de ionización de 350 °C, capilar de 3.5 kV, cono de 50 V, rango escaneado de 100 - 350 m/z (Frommberger et al., 2007; Liu et al., 2016).

III. DETERMINACIÓN DE DIURÓN EN SUELO

La determinación del herbicida diurón se realizó usando la metodología descrita en Tejada et al. (2017). El herbicida se extrajo usando metanol (2 g de suelo:10 mL de metanol) y la medida se realizó mediante HPLC. Con el fin de eliminar la actividad de los microorganismos y asegurar que solo predominaban los efectos de las condiciones abióticas, el suelo se trató con HgCl_2 . La medida de la concentración mediante HPLC fue realizada usando una columna de fase reversa Kromasil C18 (15 x 0,40 cm), a 30 °C (la columna fue suministrada por Teknokroma, España). La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo y agua en una proporción de 6:4, el flujo fue de 1 mL min^{-1} , y el volumen de inyección de 100 μL . La detección tuvo lugar mediante un detector de fotodiodos en serie a 230 nm. El límite de cuantificación fue de 0,15 mg L^{-1} .

3.4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS

Las determinaciones de materia orgánica y macro- y micronutrientes fueron llevadas a cabo de acuerdo a la metodología descrita en Rodríguez-Morgado et al., (2015a). La materia orgánica fue determinada por combustión a 550 °C durante seis horas. El contenido de grasa bruta se determinó gravimétricamente después de la extracción con hexano durante 12 h en un extractor Soxhlet (Clemente et al., 1997). Los carbohidratos solubles totales se determinaron después de la extracción con una mezcla de etanol/agua (2:3) durante 2 h. Después de la centrifugación a 4000 x g, el sobrenadante se filtró a través de un papel Whatman No. 1 y los azúcares solubles totales se estimaron colorimétricamente utilizando el método del ácido fenol-sulfúrico con una curva estándar de glucosa DuBois et al., (1956). El nitrógeno total fue determinado mediante el método Kjeldahl (MAPA, 1994). El contenido de proteína se determinó multiplicando el contenido total de nitrógeno en una proteína por el factor de conversión 5.71, que es aplicable a la proteína de soja (Orts et al., 2018). Los macro- y micronutrientes fueron determinados tras la combustión y fueron analizados por espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) usando un modelo Fisons-ARL 3410 equipado con un sistema de control y adquisición de datos. Las condiciones operacionales fueron las siguientes: el gas transportador, gas refrigerante y gas plasma es argón a 80 psi de presión; el flujo de gas transportador fue de 0,8 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, el de gas refrigerante fue de 7,5 de $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ y el de gas plasma de 0,8

L·min⁻¹, con un tiempo de integración de 1 segundo. El consumo de gas argón se dio a un poder de radiofrecuencia de 650 W.

Se realizó también una cromatografía de exclusión molecular para separar las moléculas obtenidas de los procesos de hidrólisis en función de su tamaño. Se empleó el sistema JASCO LC-4000 con una columna SuperdexPeptide™ 10/300 GL (con óptimo de separación en 0,1 – 7KDa). Los tiempos de retención en la columna se recogen en la tabla 6. Las muestras fueron centrifugadas a 12000 x g durante 30 minutos a 4 °C para lograr la eliminación de moléculas insolubles. El sobrenadante se hizo pasar por un filtro de 0,2 µm y se cargó en un bucle de 0,1 mL conectado a un sistema de purificación AKTA. Para equilibrar y eluir la columna se empleó el tampón Tris-HCl 0,25 M (pH = 7) en modo isocrático, a una velocidad de flujo de 0,5 mL min⁻¹.

TABLA 6: TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LA COLUMNA EMPLEADA EN LA CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN Y TAMAÑOS MOLECULARES CORRESPONDIENTES.

Tamaño molecular (KDa)	Tiempo de retención (min)
> 10	0 – 20,801
10 – 5	20,801-23,202
5 – 3	23,202-24,971
3 – 1	24,971-28,776
1 – 0,3	28,776- 32,946
0,3	> 32,946

Las proteínas y los péptidos fueron detectados a 280 y 215 nm con un módulo detector JASCO UV-4075 UV/Vis acoplado a la columna. A 215 nm, los picos que se observan corresponden a enlaces entre átomos de carbono, es decir, a la materia orgánica. A 280 nm los picos corresponden a anillos aromáticos, es decir, principalmente (pero no solo) a proteínas, péptidos y aminoácidos.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el objeto de estudiar si la adición de los hidrolizados produce una estimulación significativa de la actividad microbiana del suelo, así como un aumento estadísticamente significativo de la biodegradación de los herbicidas tratados, se ha realizado un análisis de la varianza (ANOVA). En los casos en que este análisis arrojó

diferencias estadísticamente significativas, se procedió a llevar a cabo la comparación de medias mediante el test post-hoc de Tukey.

Antes de proceder al análisis de la varianza, se obtuvieron los gráficos de perfiles para comprobar el comportamiento de las variables estudiadas en función del tiempo, con cada uno de los tratamientos realizados. Estos gráficos se obtuvieron, en primer lugar, para todos los tratamientos y luego se separaron los tratamientos sin bioestimulantes de los tratamientos con bioestimulantes.

Posteriormente, se realizó la prueba de esfericidad de Maunchly para comprobar si las varianzas de las diferencias entre todos los pares de grupos son iguales. Si la hipótesis nula (esfericidad) se rechaza ($p < 0,05$), se aplican técnicas multivariantes (MANOVA); por el contrario, si no se rechaza ($p > 0,05$), se aplicarán técnicas univariantes (ANOVA) para analizar:

- La igualdad de los efectos de los tratamientos (los perfiles coinciden).
- Los efectos de los tratamientos permanecen constantes a lo largo del tiempo (los perfiles son líneas rectas, paralelas al eje x),
- La ausencia de interacción entre el tiempo y los parámetros (los perfiles son paralelos entre ellos).

El tratamiento estadístico se llevó a cabo mediante el software R (R Core Team, 2018) con los paquetes car (Fox et al., 2011) y multcomp (Hothorn et al., 2008).

Con la función "lm" del paquete "car" (Fox et al., 2011) se ajustó un modelo lineal para cada variable y con la función "Anova" se obtuvo el análisis de la varianza.

Para hacer la comparación entre medias en cada instante, primero se ajustó un modelo lineal, para cada variable, con la función "lm" del paquete "multcomp" (Hothorn et al., 2008). Finalmente, se ejecuta la función "glht" de dicho paquete, utilizando el test de Tukey.

4. RESULTADOS

4.1. OBTENCIÓN DE LOS BIOESTIMULANTES A PARTIR DE OKARA

La Tabla 7 muestra los resultados químicos en cuanto a materia orgánica, macro-, micronutrientes y distribución del peso molecular de las proteínas en los bioestimulantes OB y OF obtenidos a partir de okara tras los procesos de hidrólisis enzimática descritos en el capítulo de Material y métodos de esta memoria.

TABLA 7: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y DISTRIBUCIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS (MEDIA ± ERROR ESTÁNDAR, N=3) DE LOS BIOESTIMULANTES OBTENIDOS A PARTIR DE OKARA.

	Bioestimulante OB	Bioestimulante OF
Materia seca (%)	32,1 ± 0,2	35,4 ± 0,2
Materia orgánica (g kg ⁻¹)	445 ± 12	417 ± 19
Proteína (g kg ⁻¹)	439 ± 34	383 ± 23
N (g kg ⁻¹)	108± 10	102 ± 13
P (g kg ⁻¹)	4,2 ± 0,3	5,3 ± 0,3
S (g kg ⁻¹)	8,5 ± 0,8	9,1 ± 0,5
K (g kg ⁻¹)	21,8± 1,5	24,6± 1,1
Ca (g kg ⁻¹)	2,9 ±0,7	2,5±0,4
Mg (g kg ⁻¹)	24,5 ± 3,8	27,8±2,5
Fe (mg kg ⁻¹)	65,9±3,1	64,6±2,7
Cu (mg kg ⁻¹)	12,6 ±1,5	13,7 ±1,3
Mn (mg kg ⁻¹)	27,4±1,8	26,9±1,4
Zn (mg kg ⁻¹)	28,1 ± 1,9	24,0 ± 1,4
Distribución del peso molecular de las proteínas (Da)		
>10000	5,6 ± 1,6	3,5 ± 1,3
10000- 5000	4,1 ± 1,1	3,2 ± 1,0
5000-3000	4,3 ± 1,6	3,2 ± 1,5
3000-1000	12,4 ± 1,9	8,7 ± 1,3
1000-300	17,5 ± 2,3	12,6 ± 2,2
<300	56,0 ± 2,5	68,8 ± 3,1

Tras el proceso de hidrólisis enzimática, los bioestimulantes resultantes mostraron diferencias importantes con respecto al okara puro de partida en cuanto a su composición química. En este sentido, con respecto al okara puro se observa un

aumento en el contenido de N y proteínas en los bioestimulantes OP y OF del 20,5% y 10,3%, respectivamente. También se observa un aumento del 40,5% y 46,8% en el contenido en P de OB y OF, respectivamente. Respecto a otros macronutrientes analizados, también se observa un aumento importante del S, K y Ca del 52,9%, 56,9% y 42,3% para el bioestimulante OB y del 56%, 61,8% y 36% para el bioestimulante OF.

En cuanto a los micronutrientes analizados, los nuevos bioestimulantes obtenidos por procesos de hidrólisis enzimática mostraron unos valores que no son muy diferentes a los obtenidos con respecto al okara puro, lo cual nos hace pensar que la concentración de los micronutrientes no está alterada por el proceso bioquímico de hidrólisis enzimática.

Por último, y respecto a la distribución del peso molecular de las proteínas, también se observó que se produjeron importantes cambios significativos. En este sentido las proteínas de mayor peso molecular (> 1000 kDa) disminuyeron un 93,8% y 96,1% en los bioestimulantes OB y OF respecto al okara puro. Del mismo modo y con respecto al okara puro, las proteínas de peso molecular 2000-1000 kDa para el bioestimulante OB aumentaron un 97,5% y un 91,4% para el bioestimulante OF. Por último y también con respecto al okara puro, las proteínas de menor peso molecular analizado (< 300 kDa) aumentaron un 89,5% y 91,4% en los bioestimulantes OB y OF, respectivamente.

4.2. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

4.2.1. ACTIVIDAD DESHIDROGENASA

En el gráfico de perfiles de la actividad deshidrogenasa (figura 8) se observan dos grupos con comportamientos diferentes. Por una parte, se encuentran el suelo control y los suelos contaminados con los herbicidas sin enmendar. Estos perfiles son paralelos al eje x y entre sí. Por otra parte, están los perfiles de los suelos tratados con los bioestimulantes, tanto contaminados como sin contaminar, que no son paralelos al eje x ni, aparentemente, entre sí. Teniendo esto en cuenta, se representaron los gráficos de perfiles de los dos grupos por separado (figuras 9 y 10). La figura 8 muestra una posible diferencia en la evolución de la deshidrogenasa a lo largo del tiempo en los suelos contaminados con diurón (S+D) e imazamox (S+I) respecto al suelo control y al contaminado con oxifluorfén (S+Ox). Sin embargo, en la figura 10 se sigue apreciando

que los perfiles de los suelos tratados con los bioestimulantes no muestran paralelismo entre ellos.

A continuación, se realizó un análisis de la varianza a los dos grupos por separado, con el objeto de determinar si realmente los diferentes tratamientos se comportan de la misma manera a lo largo del tiempo o, por el contrario, la actividad deshidrogenasa evoluciona de forma diferente en función del herbicida y bioestimulantes añadidos.

Con respecto al grupo formado por el suelo control y los suelos contaminados con los tres herbicidas, la prueba de esfericidad de Mauchly (tabla 8) no rechaza la hipótesis nula, por lo que se utilizarán técnicas univariantes para realizar el análisis.

Según se puede ver en la tabla 9 no hay interacción entre los tratamientos (suelo control y suelos contaminados con los tres herbicidas) y el tiempo ($p > 0,05$), lo que implica que el tiempo de incubación influye de la misma manera en la evolución de la actividad deshidrogenasa, independientemente del herbicida añadido al suelo. Tampoco hay diferencias en los valores de la actividad deshidrogenasa a lo largo del tiempo de incubación. Estos resultados se corresponden con el paralelismo de los perfiles entre ellos y con el eje x observado en la figura 8 y pone de manifiesto que las posibles diferencias que se aprecian en la figura 9 no son significativas. Finalmente, existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de la actividad de los suelos contaminados y del control ($p < 0,05$).

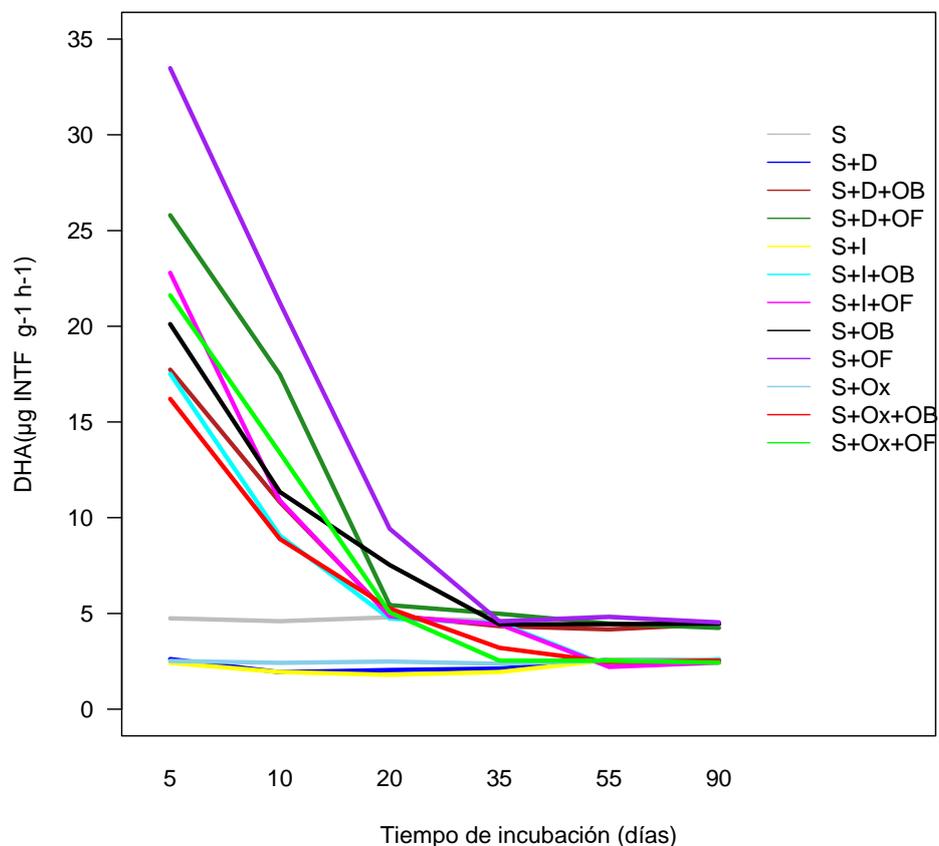


FIGURA 8: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA ACTIVIDAD DESHIDROGENASA TENIENDO EN CUENTA TODOS LOS TRATAMIENTOS.

TABLA 8: PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY PARA LA ACTIVIDAD DESHIDROGENASA DEL SUELO CONTROL Y DE LOS SUELOS CONTAMINADOS SIN ENMENDAR.

	Test statistic	p-value
Tiempo	0,16385	0,71097
Tratamiento:tiempo	0,16385	0,71097

TABLA 9: ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS PARA LA ACTIVIDAD DESHIDROGENASA DEL SUELO CONTROL Y DE LOS SUELOS CONTAMINADOS SIN ENMENDAR.

	Sum Sq	num Df	Error SS	den Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	610,46	1	7,1773	8	680,4352	5,01e-09 ***
Tratamiento	74,27	3	7,1773	8	27,5930	0,0001431 ***
Tiempo	1,96	5	13,3828	40	1,1704	0,3406111
Tratamiento:tiempo	1,78	15	13,3828	40	0,3553	0,9831812

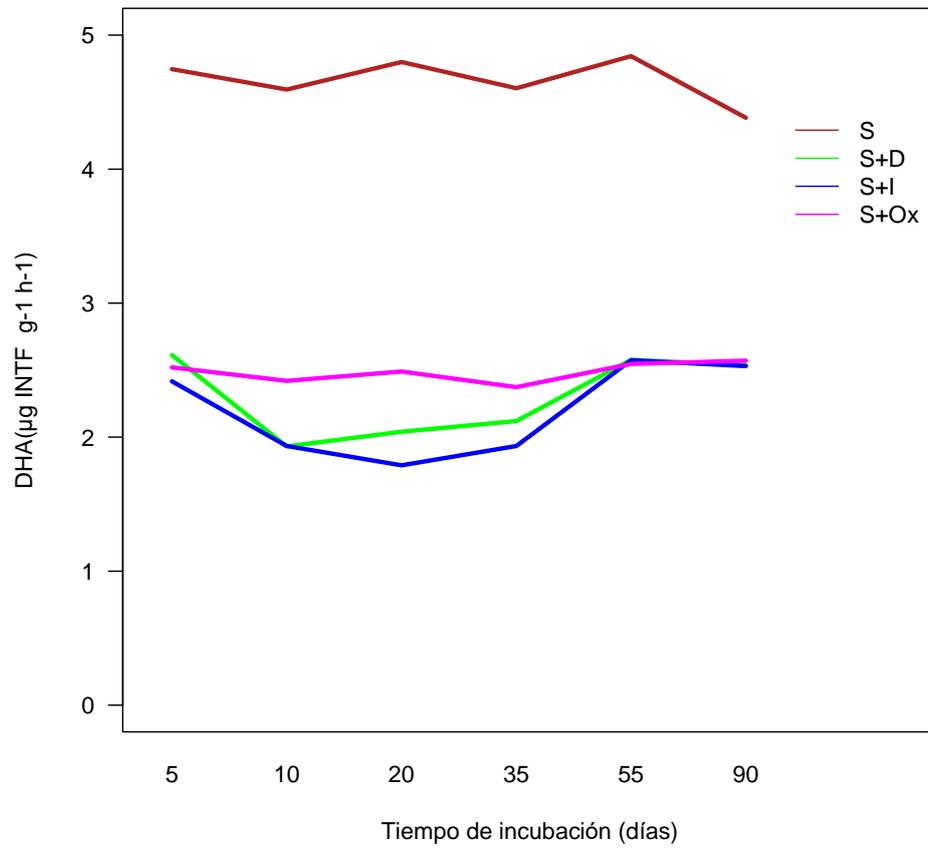


FIGURA 9: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA ACTIVIDAD DESHIDROGENASA EN EL SUELO CONTROL Y EN SUELOS CONTAMINADOS CON LOS TRES HERBICIDAS.

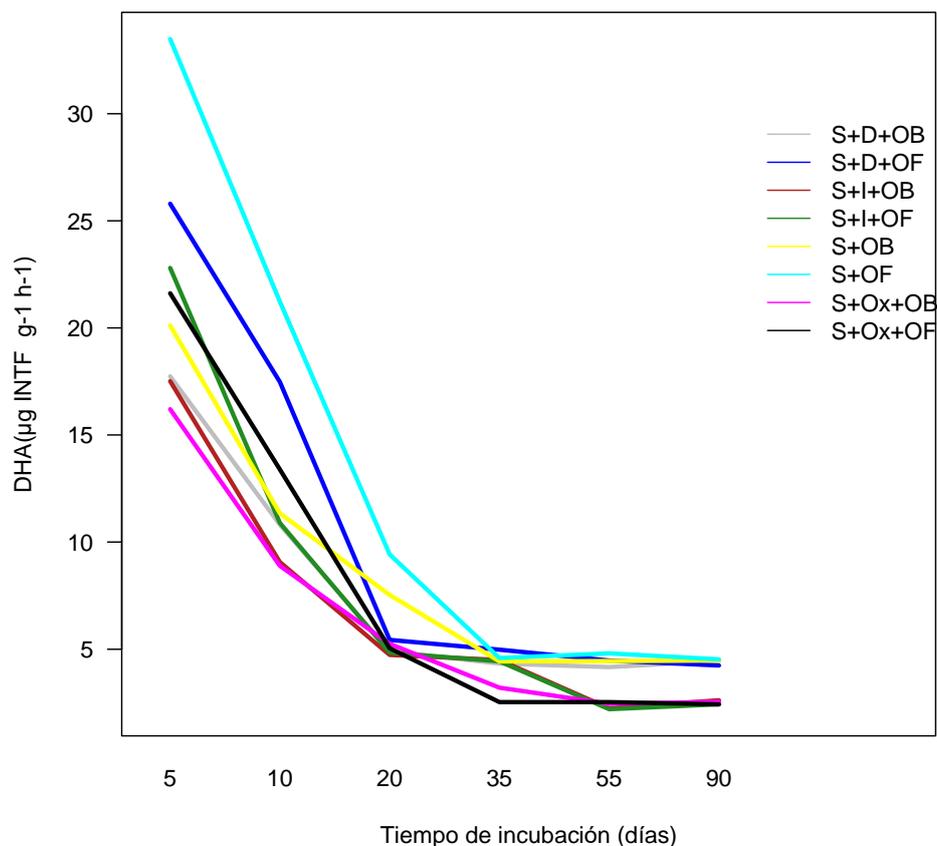


FIGURA 10: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA ACTIVIDAD DESHIDROGENASA EN SUELOS CONTAMINADOS Y NO CONTAMINADOS TRATADOS.

De acuerdo con la prueba de esfericidad de Mauchly para la actividad deshidrogenasa de los suelos tratados con bioestimulantes, tanto contaminados como sin contaminar, se aplicarán técnicas univariantes para el análisis de la varianza (ANOVA) (tabla 10).

Atendiendo a los resultados recogidos en la tabla 11 se rechaza la hipótesis nula del efecto del tratamiento (suelos enmendados con los dos bioestimulantes y suelos contaminados con los tres herbicidas y enmendados con los dos bioestimulantes) y del tiempo, así como de la interacción del tratamiento con el tiempo. Los valores de $p < 0,05$ en el efecto del tiempo y en la interacción entre tratamientos tiempo implican que no hay paralelismo de los perfiles con el eje x ni entre perfiles, como se observaba en las figuras 8 y 10. Esto supone que existen diferencias estadísticamente significativas en los datos de deshidrogenasa obtenidos a lo largo del periodo de incubación para estos tratamientos. El efecto del tratamiento también tiene un $p < 0,05$ que señala la

existencia de diferencias estadísticamente significativas para esta actividad en función del tratamiento considerado.

TABLA 10: PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY PARA LA ACTIVIDAD DESHIDROGENASA EN LOS SUELOS CONTAMINADOS Y SIN CONTAMINAR, ENMENDADOS CON BIOESTIMULANTES.

	Test statistic	p-value
Tiempo	0,49189	0,76608
Tratamiento:tiempo	0,49189	0,76608

TABLA 11: ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS PARA LA ACTIVIDAD DESHIDROGENASA EN LOS SUELOS CONTAMINADOS Y SIN CONTAMINAR, ENMENDADOS CON BIOESTIMULANTES.

	Sum Sq	num Df	Error SS	den Df	F value	Pr(>F)
(Intercept) 1	0689,0	1	13,122	16	13033,426	< 2,2e-16 ***
Tratamiento	583,2	7	13,122	16	101,595	4,644e-12 ***
Tiempo	6625,3	5	53,248	80	1990,757	< 2,2e-16 ***
Tratamiento:tiempo	604,2	35	53,248	80	25,934	< 2,2e-16 ***

4.2.2. ACTIVIDAD FOSFATASA

De forma similar a lo que ocurre con la actividad deshidrogenasa, en el gráfico de perfiles de la actividad fosfatasa para todos los tratamientos se separan dos grupos con comportamientos claramente diferentes. Uno, con perfiles paralelos al eje de abscisas y entre ellos, que engloba a los suelos contaminados con herbicidas y al suelo control, y otro con perfiles que se entrecruzan entre ellos y que agrupa a los suelos contaminados y sin contaminar, tratados con bioestimulantes (figura 11).

Al separar ambos grupos y representar gráficamente los perfiles, se vuelve a ver en la figura 12 que el suelo control y los suelos contaminados con imazamox y diurón tienen un comportamiento parecido respecto al tiempo de incubación y, aparentemente, diferente al del suelo contaminado con oxifluorfén. Del mismo modo que con la actividad deshidrogenasa, los perfiles de los suelos contaminados y sin contaminar enmendados con bioestimulantes (figura 13) no parece que sean paralelos entre sí.

Tal como se hizo en el caso de la actividad enzimática anterior, se analizaron los datos de fosfatasa para comprobar si existían o no diferencias significativas en la influencia del tratamiento, del tiempo de incubación y en la interacción entre los tratamientos y el tiempo para los dos grupos por separado.

El test de Mauchly para el grupo formado por el suelo control y los suelos contaminados no rechaza la hipótesis nula, por lo que se aplicaron técnicas univariantes al análisis de la varianza (tabla 12). El ANOVA realizado a los datos de fosfatasa para estos suelos muestra que el tiempo influye por igual ($p > 0,05$) en todos los tratamientos (interacción tratamiento:tiempo en la tabla 13) confirmando que los perfiles son paralelos entre ellos, como se apreciaba en la figura 11. Asimismo, en la mencionada tabla se comprueba que tampoco hay influencia del tiempo en la evolución de los valores de fosfatasa para ninguno de los tratamientos ($p > 0,05$). Por el contrario, el tratamiento sí afecta de manera significativa a esta actividad enzimática ($p < 0,05$).

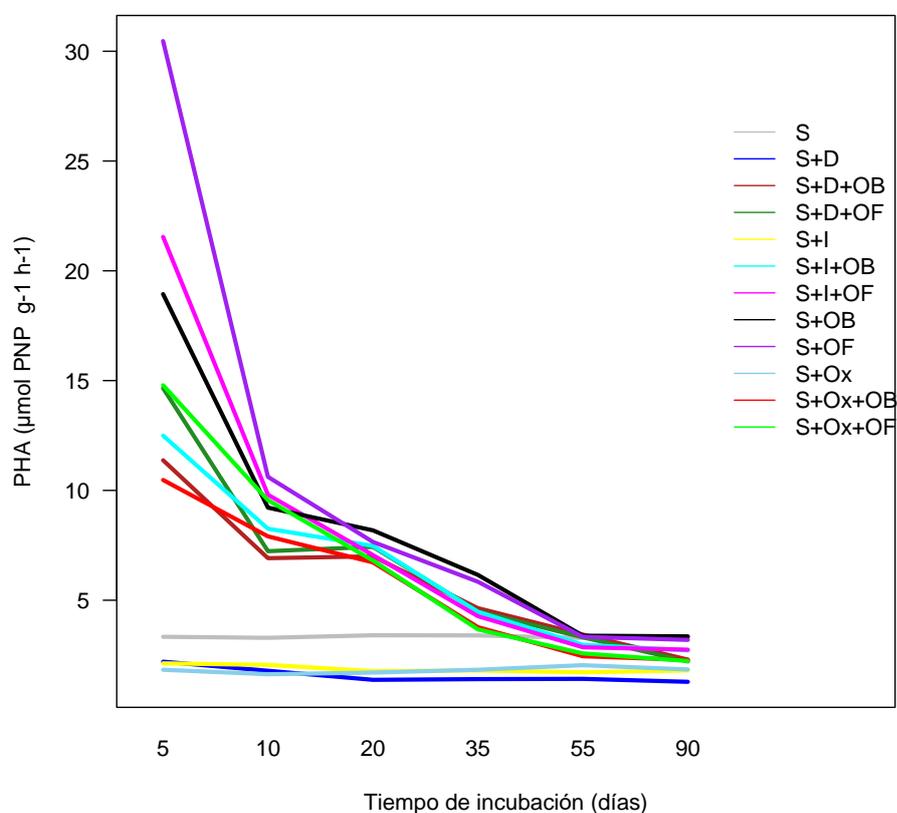


FIGURA 11: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA ACTIVIDAD FOSFATASA TENIENDO EN CUENTA TODOS LOS TRATAMIENTOS.

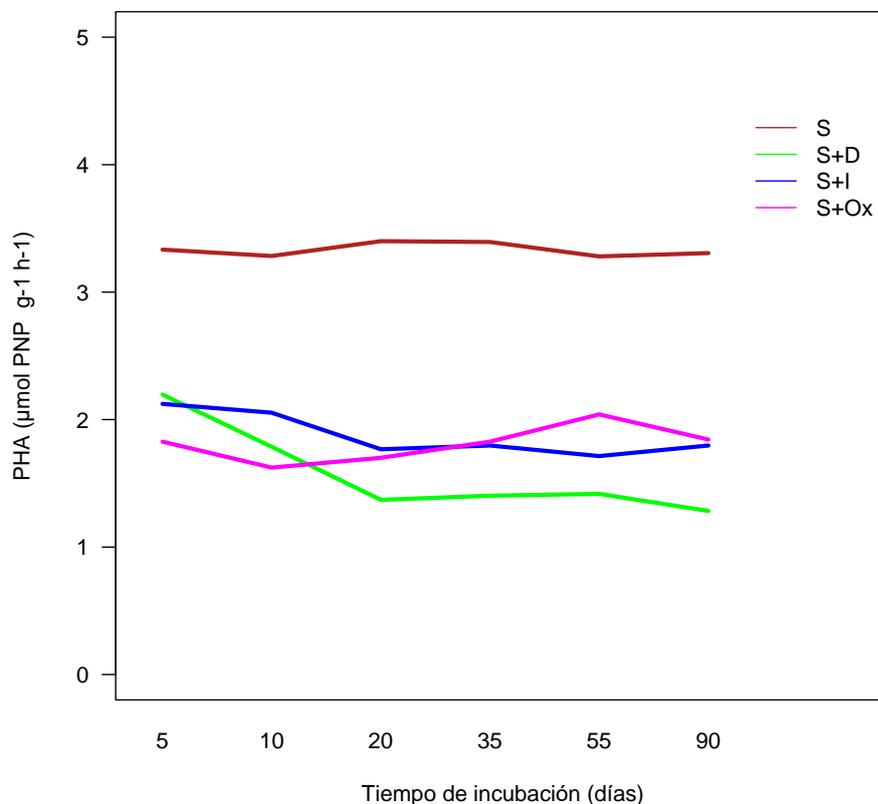


FIGURA 12: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA ACTIVIDAD FOSFATASA EN EL SUELO CONTROL Y EN LOS SUELOS CONTAMINADOS CON LOS TRES HERBICIDAS.

TABLA 12: PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY PARA LA ACTIVIDAD FOSFATASA DEL SUELO CONTROL Y DE LOS SUELOS CONTAMINADOS SIN ENMENDAR.

	Test statistic	p-value
Tiempo	0,33546	0,95296
Tratamiento:tiempo	0,33546 0	0,95296

TABLA 13: ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS PARA LA ACTIVIDAD FOSFATASA DEL SUELO CONTROL Y DE LOS SUELOS CONTAMINADOS SIN ENMENDAR.

	Sum Sq	num Df	Error SS	den Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	332,35	1	1,3792	8	1927,7833	7,989e-11 ***
Tratamiento	34,55	3	1,3792	8	66,8054	5,260e-06 ***
Tiempo	0,84	5	10,0659	40	0,6673	0,6504
Tratamiento:tiempo	1,78	15	10,0659	40	0,4707	0,9419

Con respecto al grupo formado por los suelos contaminados y no contaminados enmendados con bioestimulantes, el test de Mauchly rechaza la hipótesis nula (tabla 14), indicando que deben usarse técnicas multivariantes para el análisis de la varianza.

La tabla 15 recoge el MANOVA realizado a los resultados de la actividad fosfatasa para este segundo grupo de suelos. A diferencia del ANOVA, aquí aparecen varias pruebas para cada uno de los efectos. En principio, cualquiera de ellos puede ser utilizado para establecer si se rechazan o no las hipótesis nulas. De cualquier manera, en el caso que aquí se estudia, todos los tests rechazan dichas hipótesis, por lo que se puede afirmar: i) que el tiempo de incubación afecta de manera diferente al comportamiento de la fosfatasa en función del tratamiento realizado al suelo, ii) que la evolución de la actividad enzimática se ve afectada por el tiempo y iii) que el tratamiento realizado afecta significativamente los resultados obtenidos de dicha actividad. En definitiva, el MANOVA realizado respalda lo observado en los gráficos de perfiles (figuras 12 y 13).

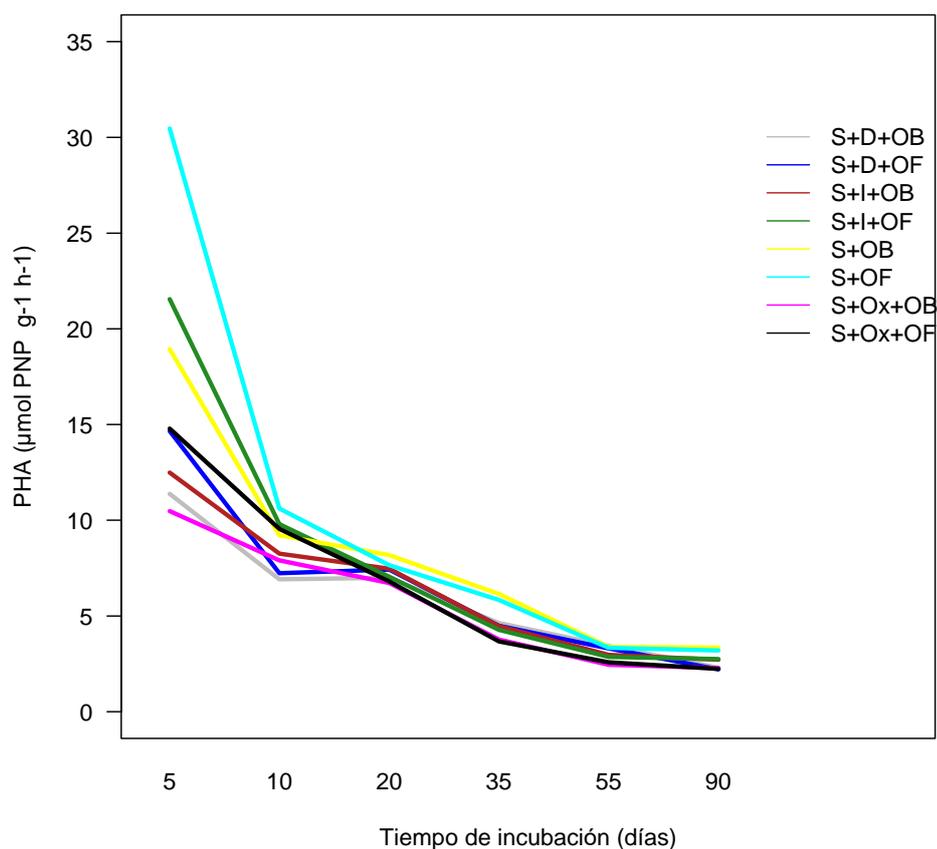


FIGURA 13: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA ACTIVIDAD FOSFATASA EN SUELOS CONTAMINADOS Y NO CONTAMINADOS TRATADOS CON BIOESTIMULANTES.

TABLA 14: PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY PARA LA ACTIVIDAD FOSFATASA EN LOS SUELOS CONTAMINADOS Y SIN CONTAMINAR, ENMENDADOS CON BIOESTIMULANTES.

	Test statistic	p-value
Tiempo	0,087752	0,002097
Tratamiento:tiempo	0,087752	0,002097

TABLA 15: MANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS PARA LA ACTIVIDAD FOSFATASA EN LOS SUELOS CONTAMINADOS Y SIN CONTAMINAR, ENMENDADOS CON BIOESTIMULANTES.

Tratamiento						
	Df	test stat	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
Pillai	5	0,95944	54,06754	7	16	5,9347e-10 ***
Wilks	5	0,04056	54,06754	7	16	5,9347e-10 ***
Hotelling-Lawley	5	23,65455	54,06754	7	16	5,9347e-10 ***
Roy	5	23,65455	54,06754	7	16	5,9347e-10 ***
Tiempo						
	Df	test stat	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
Pillai	1	0,99622	633,2379	5	12	4,2279e-14 ***
Wilks	1	0,00378	633,2379	5	12	4,2279e-14 ***
Hotelling-Lawley	1	263,84912	633,2379	5	12	4,2279e-14 ***
Roy	1	263,84912	633,2379	5	12	4,2279e-14 ***
Tratamiento:tiempo						
	Df	test stat	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
Pillai	7	0,95944	54,06754	7	16	5,9347e-10 ***
Wilks	7	0,04056	54,06754	7	16	5,9347e-10 ***
Hotelling-Lawley	7	23,65455	54,06754	7	16	5,9347e-10 ***
Roy	7	23,65455	54,06754	7	16	5,9347e-10 ***

4.2.3. ACTIVIDAD GLUCOSIDASA

El gráfico de perfiles de la figura 14 es parecido al de las dos actividades anteriores, mostrando dos grupos con comportamientos diferentes. En el suelo control y los suelos contaminados con los tres herbicidas, los perfiles son paralelos entre sí y al eje de abscisas. La figura 15, por su parte, evidencia una posible diferencia en la evolución de la actividad β -glucosidasa en el suelo contaminado con imazamox con respecto a los suelos contaminados con oxifluorfen y diuron y al suelo control.

De nuevo, se procede al análisis de la varianza para establecer si realmente hay diferencias en la tendencia que siguen los valores de esta actividad a lo largo del tiempo de incubación en estos suelos. La prueba de esfericidad de Mauchly (tabla 16) sugiere

que se realice un análisis de la varianza con técnicas multivariante ($p < 0,05$). El MANOVA de la tabla 17 confirma que el tiempo de incubación no afecta a los valores de la β -glucosidasa, en ninguno de estos tratamientos. Es decir, las diferencias observadas en los perfiles de la figura 15 no son estadísticamente significativas.

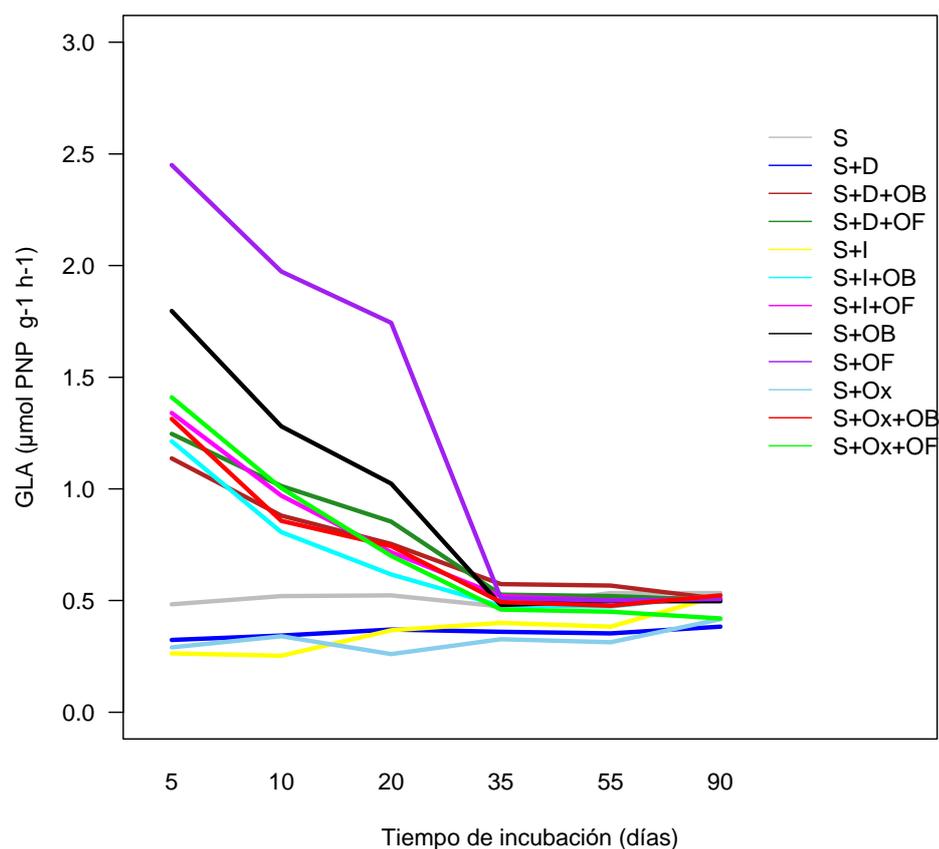


FIGURA 14: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA ACTIVIDAD GLUCOSIDASA TENIENDO EN CUENTA TODOS LOS TRATAMIENTOS.

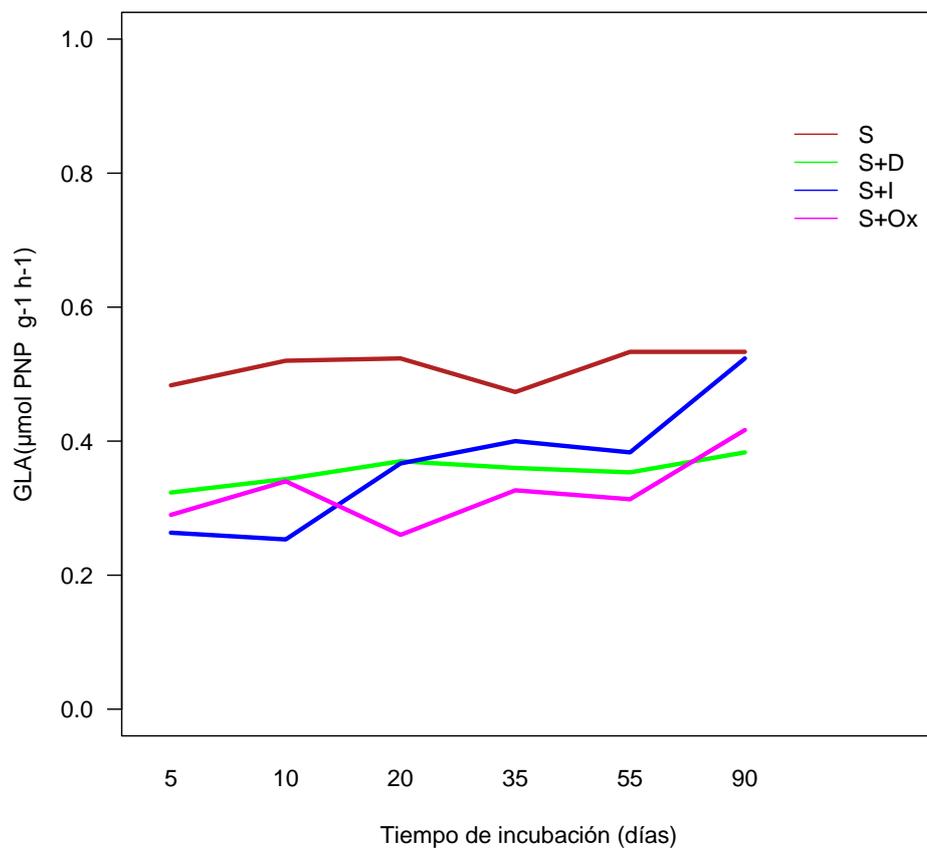


FIGURA 15: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA ACTIVIDAD GLUCOSIDASA EN EL SUELO CONTROL Y EN LOS SUELOS CONTAMINADOS CON LOS TRES HERBICIDAS.

TABLA 16: PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY PARA LA ACTIVIDAD GLUCOSIDASA DEL SUELO CONTROL Y DE LOS SUELOS CONTAMINADOS SIN ENMENDAR.

	Test statistic	p-value
Tiempo	0,011341	0,024797
Tratamiento:tiempo	0,011341 0	0,024797

TABLA 17: MANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS PARA LA ACTIVIDAD GLUCOSIDASA DEL SUELO CONTROL Y DE LOS SUELOS CONTAMINADOS SIN ENMENDAR.

Tratamiento						
	Df	test stat	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
Pillai	3	0,7202315	6,865023	3	8	0,013277 *
Wilks	3	0,2797685	6,865023	3	8	0,013277 *
Hotelling-Lawley	3	2,5743837	6,865023	3	8	0,013277 *
Roy	3	2,5743837	6,865023	3	8	0,013277 *
Tiempo						
	Df	test stat	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
Pillai	1	0,6714608	1,635022	5	4	0,32711
Wilks	1	0,3285392	1,635022	5	4	0,32711
Hotelling-Lawley	1	2,0437772	1,635022	5	4	0,32711
Roy	1	2,0437772	1,635022	5	4	0,32711
Tratamiento:tiempo						
	Df	test stat	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
Pillai	3	1,1517632	0,7478024	15	18,00000	0,71237
Wilks	3	0,1808352	0,6545765	15	11,44364	0,78188
Hotelling-Lawley	3	2,7750929	0,4933499	15	8,00000	0,88662
Roy	3	1,9339605	2,3207526	5	6,00000	0,16736

A diferencia de lo observado en los perfiles de los suelos contaminados y sin contaminar enmendados con los bioestimulantes en las actividades deshidrogenasa y fosfatasa, en la β -glucosidasa se distinguen dos comportamientos diferentes. Por un lado, los suelos no contaminados y tratados con bioestimulantes y, por otro, los suelos contaminados y enmendados (figura 16). El análisis multivariante de estos datos (tabla 18) corrobora estas afirmaciones, dando como resultado que existen diferencias estadísticamente significativas, tanto entre los tratamientos (Tratamientos, $p < 0,05$), como en la influencia del tiempo de incubación (Tiempo, $p < 0,05$) y en la evolución de la actividad a lo largo del tiempo para los diferentes tratamientos (tratamiento:tiempo, $p < 0,05$). Como se puede observar en la tabla 19, en todos los tests se obtienen valores de $p < 0,05$, tanto para la influencia del tiempo como para el tratamiento, sin embargo, en la interacción tratamiento:tiempo, el test de Pillai arroja un valor de $p > 0,05$, lo que indicaría que los perfiles son paralelos entre ellos. Esto, unido al comportamiento de los perfiles de los suelos contaminados y enmendados que muestra la figura 16, sugiere que se analicen los datos de la actividad β -glucosidasa en estos suelos por separado.

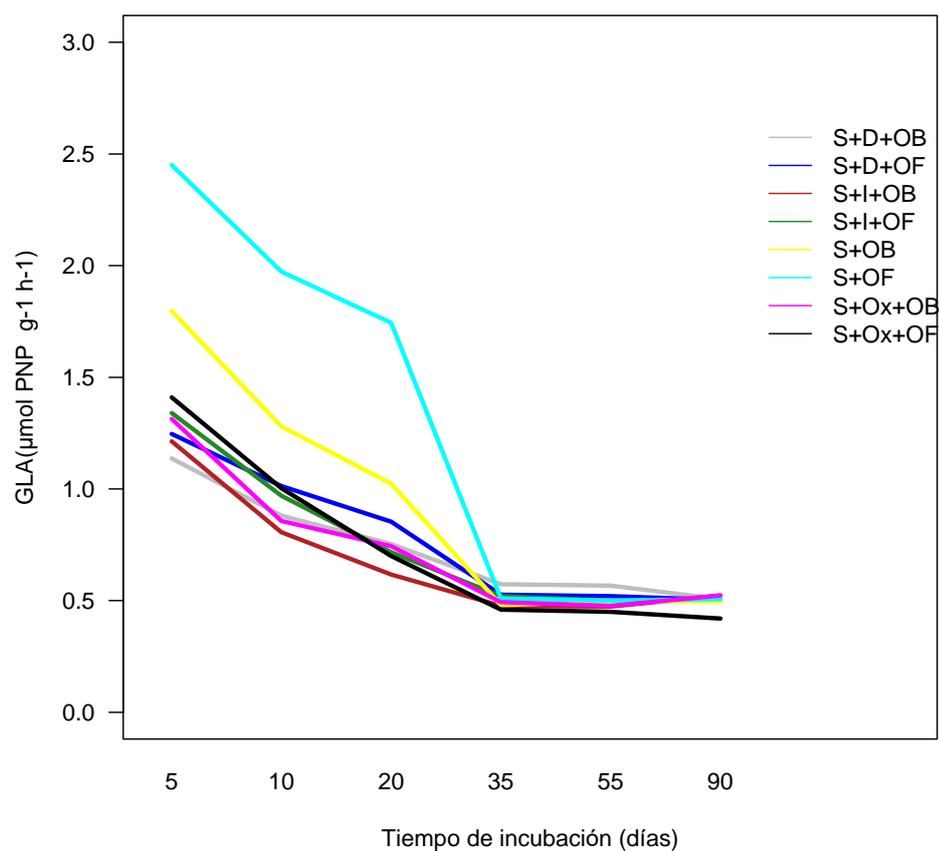


FIGURA 16: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA ACTIVIDAD GLUCOSIDASA EN SUELOS CONTAMINADOS Y NO CONTAMINADOS TRATADOS CON BIOESTIMULANTES.

TABLA 18: PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY PARA LA ACTIVIDAD GLUCOSIDASA EN LOS SUELOS CONTAMINADOS Y SIN CONTAMINAR, ENMENDADOS CON BIOESTIMULANTES.

	Test statistic	p-value
Tiempo	0,010724	1,3264e-06
Tratamiento:tiempo	0,010724	1,3264e-06

TABLA 19: MANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS PARA LA ACTIVIDAD GLUCOSIDASA EN LOS SUELOS CONTAMINADOS Y SIN CONTAMINAR, ENMENDADOS CON BIOESTIMULANTES.

Tratamiento						
	Df	test stat	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
Pillai	1	0,9860	140,8966	5	10	6,1903e-09 ***
Wilks	1	0,0140	140,8966	5	10	6,1903e-09 ***
Hotelling-Lawley	1	70,4483	140,8966	5	10	6,1903e-09 ***
Roy	1	70,4483	140,8966	5	10	6,1903e-09 ***
Tiempo						
	Df	test stat	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
Pillai	1	0,9860	140,8966	5	10	6,1903e-09 ***
Wilks	1	0,0140	140,8966	5	10	6,1903e-09 ***
Hotelling-Lawley	1	70,4483	140,8966	5	10	6,1903e-09 ***
Roy	1	70,4483	140,8966	5	10	6,1903e-09 ***
Tratamiento:tiempo						
	Df	test stat	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
Pillai	6	1,562231	1,06034	30	70	0,4087205
Wilks	6	0,021210	2,26854	30	42	0,0072094 **
Hotelling-Lawley	6	22,992964	6,43803	30	42 3	3,3340e-08 ***
Roy	6	22,143924	51,66916	6	14 9	9,3708e-09 ***

Así pues, al representar solo los perfiles de los suelos contaminados y enmendados (figura 17) se ve que, en principio, hay coincidencia de perfiles y un cierto paralelismo entre algunos de ellos, indicando que el tratamiento no afectará significativamente a los valores de esta actividad, así como tampoco habrá diferencias en la tendencia de los diferentes tratamientos a lo largo del tiempo de incubación.

Como se hizo anteriormente, se procedió al análisis de la varianza, que, de nuevo, a la luz de los resultados arrojados por el test de esfericidad de Mauchly (tabla 20) debe realizarse utilizando técnicas multivariantes. La tabla 21 apoya la coincidencia de perfiles, ya que todas las pruebas dan valores de $p > 0,05$ para la influencia del tratamiento en los valores de la actividad. Asimismo, se confirma que hay paralelismo de perfiles, es decir, el tiempo de incubación influye de la misma manera en todos los tratamientos (tratamiento:tiempo, $p > 0,05$). Por último, los perfiles no son paralelos al eje de abscisas, lo que indica que los resultados de esta actividad varían de manera significativa a lo largo del periodo de incubación (Tiempo, $p < 0,05$).

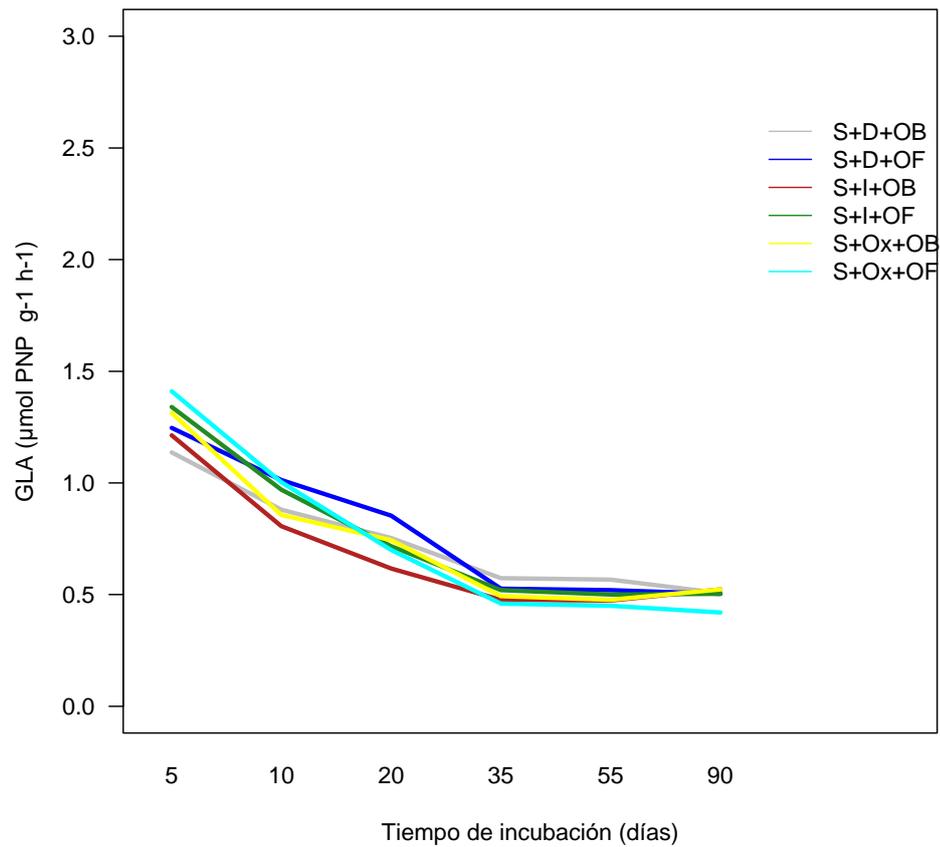


FIGURA 17: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA ACTIVIDAD GLUCOSIDASA EN SUELOS CONTAMINADOS Y TRATADOS CON BIOESTIMULANTES.

TABLA 20: PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY PARA LA ACTIVIDAD GLUCOSIDASA EN LOS SUELOS CONTAMINADOS Y TRATADOS CON BIOESTIMULANTES.

	Test statistic	p-value
design	0,0022943	1,4982e-05
gla.hbs\$trt:desi	0,0022943	1,4982e-05

TABLA 21: MANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS PARA LA ACTIVIDAD GLUCOSIDASA EN LOS SUELOS CONTAMINADOS Y TRATADOS CON BIOESTIMULANTES.

Tratamiento						
	Df	test stat	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
Pillai	4	0,1685184	0,5066812	4	10	0,73231
Wilks	4	0,8314816	0,5066812	4	10	0,73231
Hotelling-Lawley	4	0,2026725	0,5066812	4	10	0,73231
Roy	4	0,2026725	0,5066812	4	10	0,73231
Tiempo						
	Df	test stat	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
Pillai	1	0,98333	70,76509	5	6	2,9857e-05 ***
Wilks	1	0,01667	70,76509	5	6	2,9857e-05 ***
Hotelling-Lawley	1	58,97091	70,76509	5	6	2,9857e-05 ***
Roy	1	58,97091	70,76509	5	6	2,9857e-05 ***
Tratamiento:tiempo						
	Df	test stat	approx F	Sum Df	den Df	Pr(>F)
Pillai	4	1,3549984	0,922116	20	6,00000	0,565575
Wilks	4	0,1484537	0,810380	20	0,84962	0,679167
Hotelling-Lawley	4	2,9178085	0,656507	20	8,00000	0,819132
Roy	4	1,8207146	3,277286	5	9,00000	0,058341

4.2.4. ACTIVIDAD UREASA

Los perfiles para la actividad ureasa tienen un comportamiento diferente al observado en las actividades enzimáticas anteriores. Si bien se sigue observando dos grupos con comportamientos diferentes, estos no están formados por los mismos tratamientos que en los casos hasta ahora expuestos. En primer lugar, hay un grupo formado por el suelo control y los suelos contaminados con oxifluorfen y diuron, enmendados y sin enmendar con los bioestimulantes. Estos perfiles son paralelos al eje de abscisas y entre ellos (figuras 18 y 19). En segundo lugar, están los suelos contaminados con imazamox y tratados con bioestimulantes, que no son paralelos al eje del tiempo de incubación, pero si parecen ser paralelos entre ellos (figuras 18 y 20).

De igual forma que en las actividades anteriores, se procedió al análisis de la varianza para constatar lo observado en los gráficos de perfiles. En este caso, las pruebas de esfericidad de Mauchly (tabla 22 y 23) sugieren que se realice el análisis con técnicas univariantes.

El ANOVA del grupo formado por el suelo control y los suelos contaminados con oxifluorfén y diurón, enmendados y sin enmendar, constata lo deducido del gráfico de perfiles. Por tanto, la actividad ureasa en estos suelos no se ve afectada por el tiempo de incubación ($p > 0,05$). El único factor que influye es el tratamiento ($p < 0,05$) y, como se extrae del gráfico de perfiles (figura 18), las diferencias se producen entre los suelos contaminados con oxifluorfén, enmendados y sin enmendar y el resto (tabla 22).

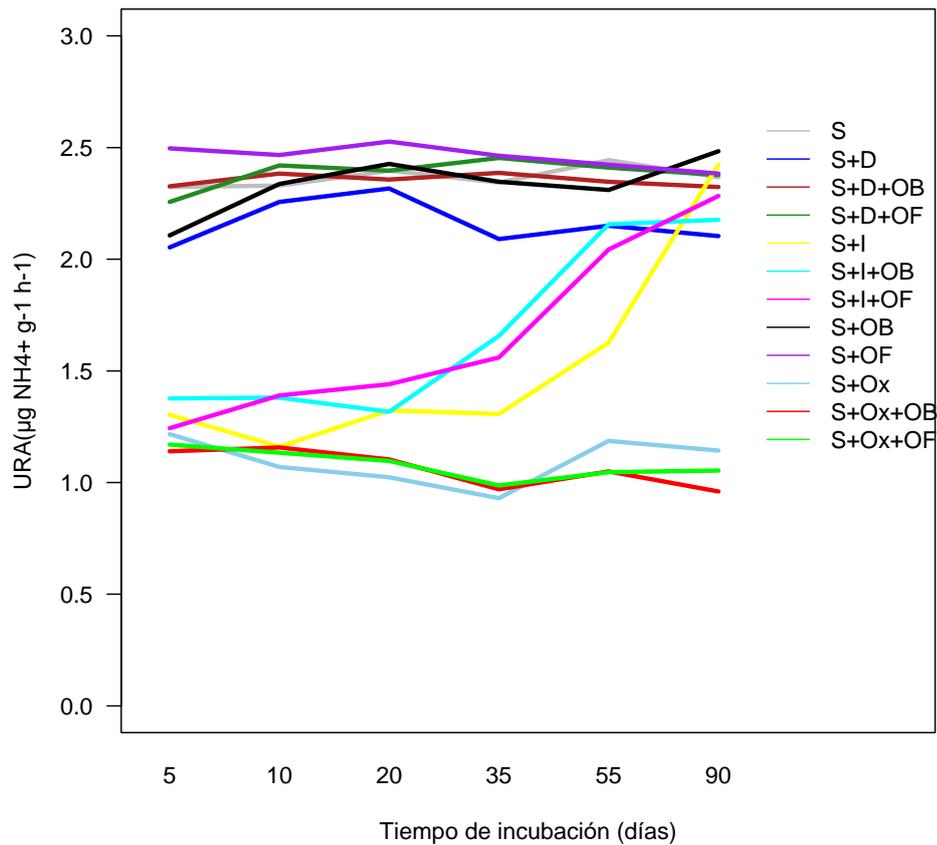


FIGURA 18: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA ACTIVIDAD UREASA TENIENDO EN CUENTA TODOS LOS TRATAMIENTOS .

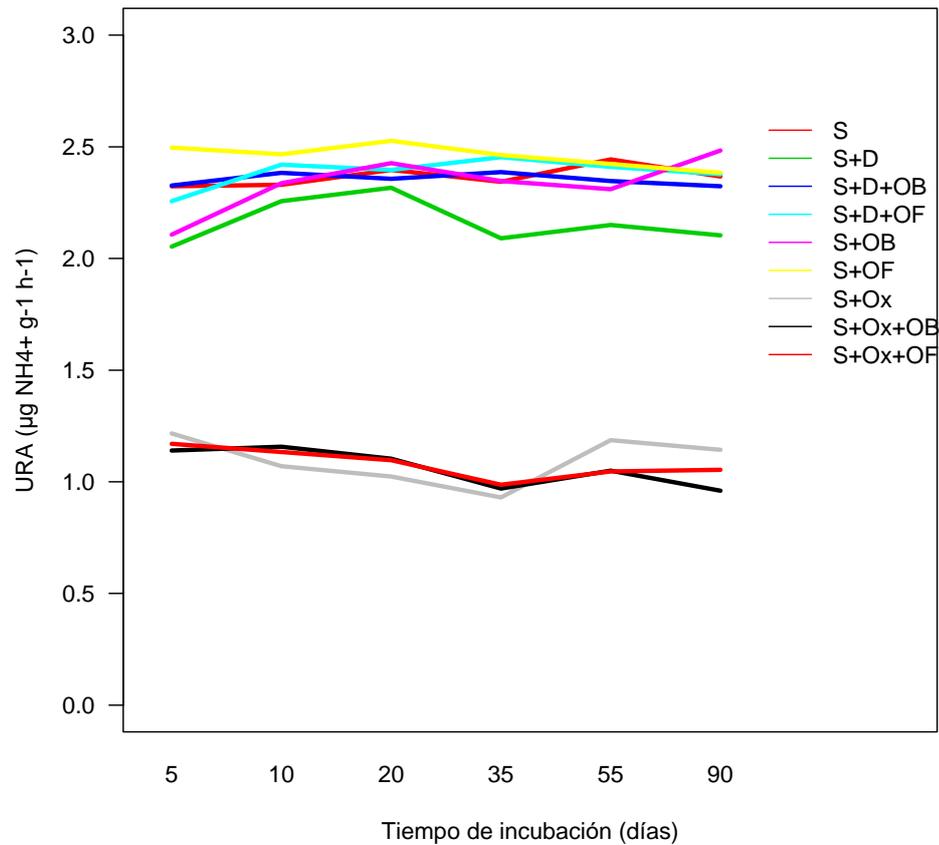


FIGURA 19: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA ACTIVIDAD UREASA EN EL SUELO CONTROL Y EN SUELOS CONTAMINADOS CON OXIFLUORFÉN Y DIURÓN Y TRATADOS CON BIOESTIMULANTES.

TABLA 22: PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY PARA LA ACTIVIDAD UREASA EN LOS SUELOS SIN CONTAMINAR Y CONTAMINADOS CON OXIFLUORFÉN Y DIURÓN Y ENMENDADOS CON BIOESTIMULANTES.

	Test statistic	p-value
Tiempo	0,4948	0.77209
Tratamiento:tiempo	0,4948	0.77209

TABLA 23: ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS PARA LA ACTIVIDAD UREASA EN LOS SUELOS SIN CONTAMINAR Y CONTAMINADOS CON OXIFLUORFÉN Y DIURÓN Y ENMENDADOS CON BIOESTIMULANTES.

	Sum Sq	num Df	Error SS	den Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	501.91	1	9.5087	16	844.5476	2.828e-15 ***
Tratamiento	54.41	7	9.5087	16	13.0799	1.494e-05 ***
Tiempo	0.12	5	1.8297	80	1.0348	0.4031
Tratamiento:tiempo	0.76	35	1.8297	80	0.9493	0.5568

Al separar los suelos contaminados con imazamox y realizar el análisis de la varianza (tabla 24) se comprueba que el herbicida imazamox tienen un efecto diferente a los otros dos en el suelo. Los perfiles de los suelos con imazamox, tanto enmendados como sin enmendar son paralelos entre sí, como demuestra el valor de $p > 0,05$ en la interacción tratamiento:tiempo de la tabla 25. Otro aspecto a resaltar en estos suelos es que la adición de los bioestimulantes no afecta a la degradación del imazamox, como se deduce del valor de $p > 0,05$ en el efecto del tratamiento. Finalmente, el tiempo afecta significativamente a la evolución la actividad ureasa en suelos contaminados con imazamox como se desprende del valor de $p < 0,05$.

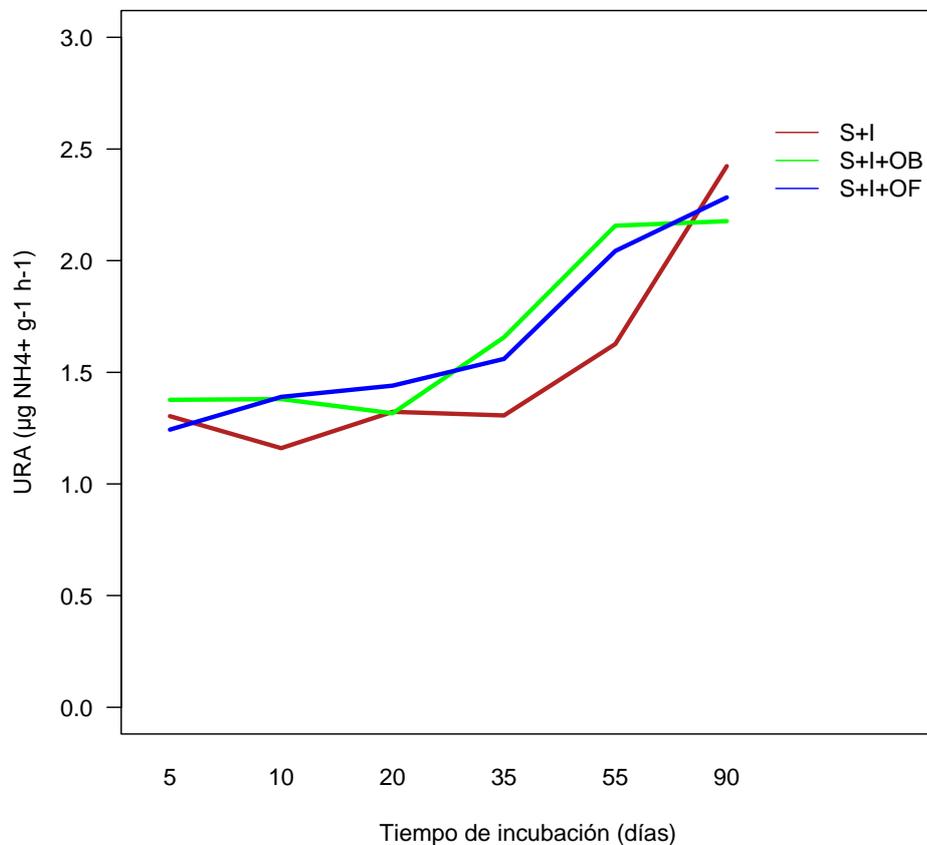


FIGURA 20: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA ACTIVIDAD UREASA EN EL SUELO CON IMAZAMOX Y TRATADOS CON BIOESTIMULANTES.

TABLA 24: PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY PARA LA ACTIVIDAD UREASA EN LOS SUELOS CONTAMINADOS CON IMAZAMOX Y ENMENDADOS CON BIOESTIMULANTES.

	Test statistic	p-value
Tiempo	0,065505	0,73477
Tratamiento:tiempo	0,065505	0,73477

TABLA 25: ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS PARA LA ACTIVIDAD UREASA EN LOS SUELOS CONTAMINADOS CON IMAZAMOX Y ENMENDADOS CON BIOESTIMULANTES.

	Sum Sq	num Df	Error SS	den Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	141,782	1	0,29172	6	2916,1112	2,707e-09 ***
Tratamiento	0,254	2	0,29172	6	2,6121	0,1528
Tiempo	7,492	5	1,88154	30	23,8920	1,246e-09 ***
Tratamiento:tiempo	0,658	10	1,88154	30	1,0495	0,4288

Una vez realizado el análisis de la varianza y visto que, tanto los tratamientos como el tiempo de incubación y la interacción entre ellos afectan significativamente los valores de las actividades enzimáticas, se procedió a realizar el test de Tukey para determinar qué tratamientos producen estas diferencias. A la luz de los gráficos de perfiles y los resultados del análisis de la varianza de los distintos grupos de suelos, se decidió aplicar el test post-hoc a los suelos agrupados por herbicidas. De esta manera, se presentarán en los siguientes apartados las evoluciones de las actividades enzimáticas para oxifluorfén, imazamox y diurón, respectivamente. Además, se contrastarán las medias de los suelos contaminados con las del suelo control y las de los suelos enmendados con los bioestimulantes para establecer la extensión en que tiene lugar la biorremediación de estos suelos mediante el uso de los bioestimulantes obtenidos de la okara.

4.3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE CONCENTRACIÓN DE HERBICIDAS

Para determinar si la adición de los bioestimulantes ensayados producen o no diferencias estadísticamente significativas en la degradación de los herbicidas en el suelo, se procedió de modo análogo a como se hizo con las actividades enzimáticas.

Es este caso, el control es el suelo contaminado sin enmendar y se contrasta el efecto de los suelos enmendados con los distintos bioestimulantes.

Los gráficos de perfiles de los tres herbicidas siguen una misma tendencia (figuras 21, 22 y 23). Aparentemente, los perfiles son paralelos entre ellos, denotando que los tratamientos evolucionan de la misma forma a lo largo del tiempo de incubación, así como que los tratamientos afectan a la degradación de los herbicidas, obteniéndose los valores más bajos para los suelos tratados con el bioestimulante "OF" en los suelos contaminados con oxifluorfén e imazamox y para los tratados con "OB" en los contaminados con diurón.

Para comprobar si los perfiles son realmente paralelos, se realizó el análisis de la varianza para cada uno de los herbicidas. La prueba de esfericidad de Mauchly para los tres casos no rechaza la hipótesis nula (tablas 26, 28 y 30), con lo que se deben usar técnicas univariantes para llevar a cabo el análisis estadístico. En las tablas 27, 29 y 31 se recogen los ANOVA de los tres herbicidas. Se confirma que la adición de bioestimulantes aumenta significativamente la degradación de todos los herbicidas; asimismo, se constata que el tiempo de incubación influye también de manera significativa en dicha degradación. Sin embargo, la interacción tratamiento:tiempo (paralelismo de perfiles) es significativa en los suelos contaminados con imazamox y en los contaminados con diurón, y no lo es en los contaminados con oxifluorfén (tablas 27, 29 y 31). Por consiguiente, en los suelos contaminados con imazamox o diurón, el tiempo afecta de forma diferente a los tratamientos, mientras que en el caso de los suelos con oxifluorfén, el tiempo no influye en cómo evoluciona la degradación de ambos herbicidas.

Por último, a la vista de los resultados obtenidos en el ANOVA de la degradación de los herbicidas, se procedió, igual que con las actividades enzimáticas, a realizar la comparación de medias (test post-hoc) mediante la prueba de Tukey. Los resultados de este test se muestran en los siguientes apartados.

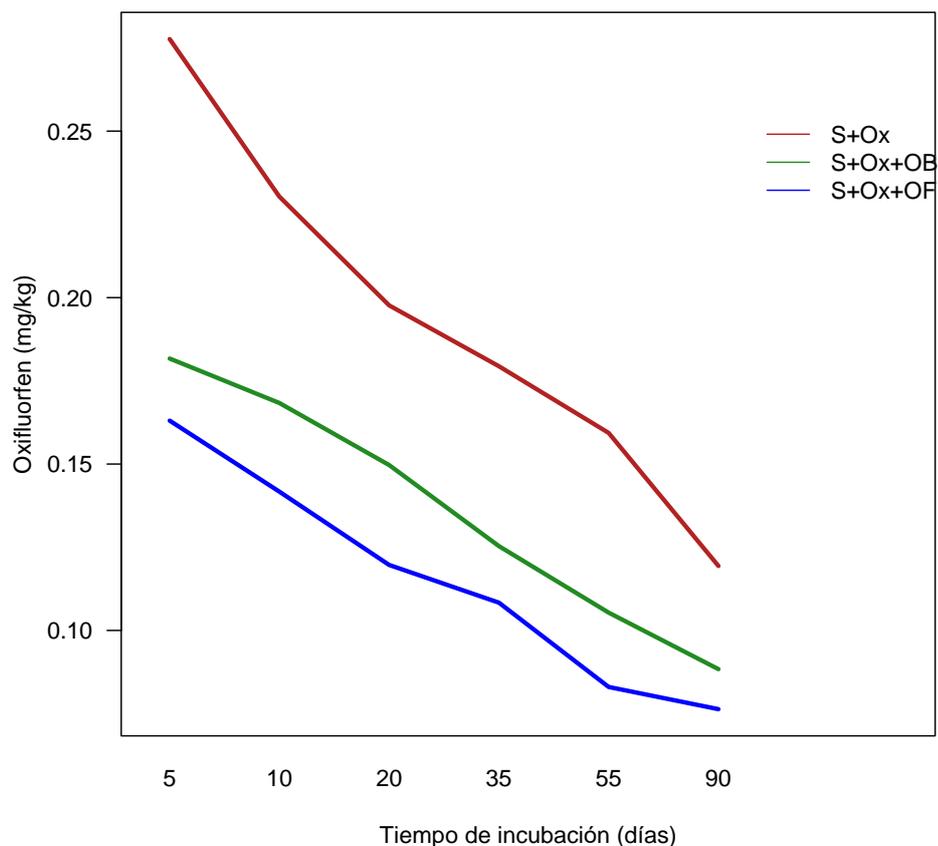


FIGURA 21: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA EVOLUCIÓN DE OXIFLUORFÉN EN SUELOS ENMENDADOS Y SIN ENMENDAR.

TABLA 26: PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY PARA LA DEGRADACIÓN DE OXIFLUORFÉN EN SUELOS.

	Test statistic	p-value
Tiempo	0,015599	0,33064
Tratamiento:tiempo	0,015599	0,33064

TABLA 27: ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS PARA LA DEGRADACIÓN DE OXIFLUORFÉN EN SUELOS.

	Sum Sq	num Df	Error SS	den Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	1,19201	1	0,0016359	6	4371,9710	8,048e-10 ***
Tratamiento	0,05959	2	0,0016359	6	109,2797	1,907e-05 ***
Tiempo	0,07744	5	0,0078788	30	58,9700	1,303e-14 ***
Tratamiento:tiempo	0,00527	10	0,0078788	30	2,0065	0,06871

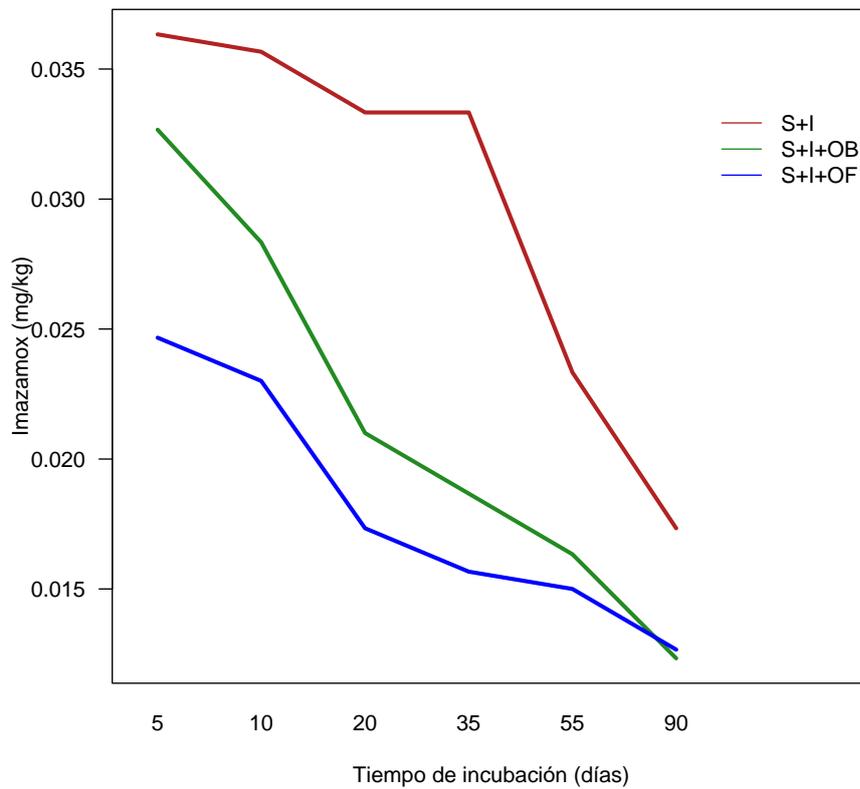


FIGURA 22: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA EVOLUCIÓN DE IMAZAMOX EN SUELOS ENMENDADOS Y SIN ENMENDAR.

TABLA 28: PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY PARA LA DEGRADACIÓN DE IMAZAMOX EN SUELOS.

	Test statistic	p-value
Tiempo	0,0043114	0,1145
Tratamiento:tiempo	0,0043114	0,1145

TABLA 29: ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS PARA LA DEGRADACIÓN DE IMAZAMOX EN SUELOS.

	Sum Sq	num Df	Error SS	den Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	0,0289815	1	7,0333e-05	6	2472,3555	4,438e-09 ***
Tratamiento	0,0013303	2	7,0333e-05	6	56,7441	0,0001266 ***
Tiempo	0,0018564	5	2,0767e-04	30	53,6356	4,652e-14 ***
Tratamiento:tiempo	0,0002508	10	2,0767e-04	30	3,6228	0,0029859 **

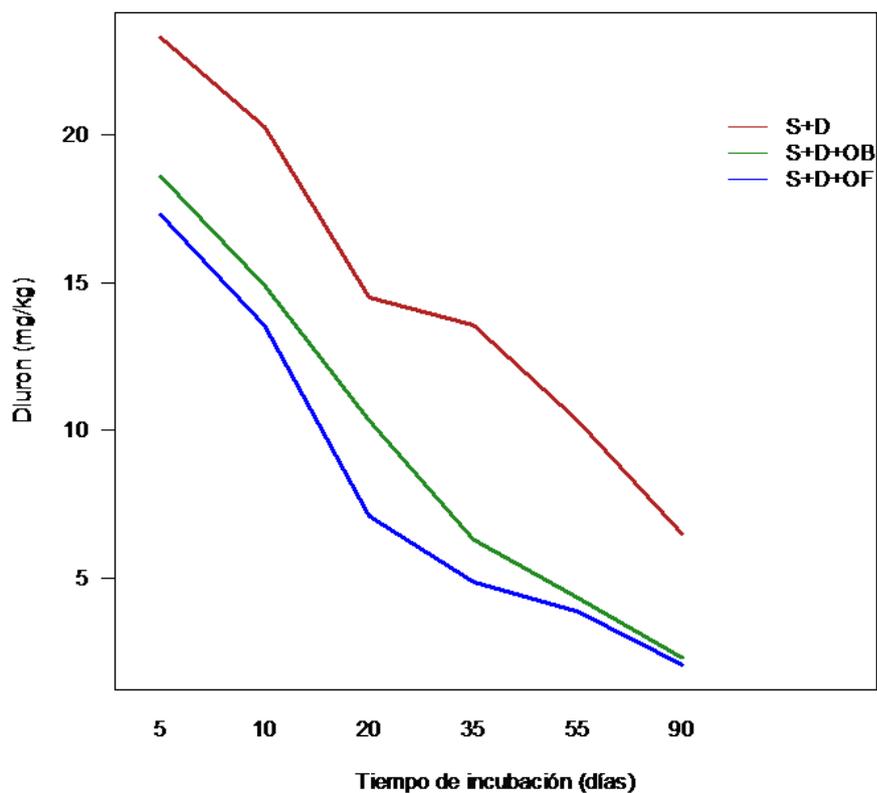


FIGURA 23: GRÁFICO DE PERFILES PARA LA EVOLUCIÓN DE DIURÓN EN SUELOS ENMENDADOS Y SIN ENMENDAR .

TABLA 30: PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY PARA LA DEGRADACIÓN DE DIURÓN EN SUELOS.

	Test statistic	p-value
Tiempo	0,0049698	0,13042
Tratamiento:tiempo	0,0049698	0,13042

TABLA 31: ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS PARA LA DEGRADACIÓN DE DIURÓN EN SUELOS.

	Sum Sq	num Df	Error SS d	den Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	6270,5	1	3,0133	6	12485,5313	3,464e-11 ***
Tratamiento	441,4	2	3,0133	6	439,4074	3,118e-07 ***
Tiempo	1698,9	5	16,6667	30	611,5907	< 2,2e-16 ***
Tratamiento:tiempo	22,9	10	16,6667	30	4,1283	0,00

4.4. PRIMERA EXPERIENCIA DE INCUBACIÓN

La aplicación del herbicida oxifluorfén ocasionó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la actividad de la deshidrogenasa del suelo durante todo el período experimental (tabla 32). En este sentido, al final del periodo de incubación y en comparación con el suelo no contaminado y no enmendado orgánicamente, esta actividad enzimática significativamente ($p < 0,05$) disminuyó un 43,4%.

TABLA 32: EVOLUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES DESHIDROGENASA Y UREASA (MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR, N = 3) EN SUELOS ENMENDADOS CON LOS BIOESTIMULANTES EXPERIMENTALES Y CONTAMINADOS CON OXIFLUORFÉN DURANTE EL PERIODO DE INCUBACIÓN. COLUMNAS CON LA MISMA LETRA(S) NO PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p > 0,05$). INTF: 2-P-IODO-3-NITROPHENYL FORMAZÁN.

	Días de incubación					
	5	10	20	35	55	90
Actividad deshidrogenasa ($\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$)						
S	4,7b \pm 1,0	4,6b \pm 0,8	4,8b \pm 1,1	4,6b \pm 1,2	4,8b \pm 1,0	4,6b \pm 0,9
S+OF	33,5e \pm 2,5	21,2d \pm 1,9	9,4c \pm 1,8	4,6b \pm 1,9	4,8b \pm 1,3	4,5a \pm 1,2
S+OB	20,4d \pm 2,7	11,4c \pm 2,2	7,5b \pm 1,5	4,2b \pm 1,0	4,4b \pm 1,3	4,5b \pm 1,4
S+Ox	2,5a \pm 0,75	2,4a \pm 0,84	2,5a \pm 1,0	2,4a \pm 0,66	2,5a \pm 0,96	2,6a \pm 0,62
S+Ox+OF	21,6d \pm 1,6	13,3c \pm 1,9	5,0b \pm 1,6	2,3a \pm 0,83	2,5a \pm 1,0	2,4a \pm 0,91
S+Ox+OB	16,1c \pm 2,0	8,9bc \pm 1,7	5,3b \pm 1,4	3,2a \pm 0,91	2,4a \pm 0,89	2,5a \pm 0,88
Actividad ureasa ($\mu\text{g NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$)						
S	2,3b \pm 0,4	2,2b \pm 0,4	2,2b \pm 0,4	2,3b \pm 0,5	2,3b \pm 0,4	2,4b \pm 0,3
S+OF	2,5b \pm 0,3	2,4b \pm 0,2	2,3b \pm 0,4	2,5b \pm 0,4	2,4b \pm 0,3	2,5b \pm 0,5
S+OB	2,4b \pm 0,5	2,5b \pm 0,3	2,4b \pm 0,5	2,4b \pm 0,5	2,2b \pm 0,3	2,3b \pm 0,2
S+Ox	1,2a \pm 0,3	1,1a \pm 0,3	1,0a \pm 0,2	0,95a \pm 0,15	1,1a \pm 0,2	1,1a \pm 0,3
S+Ox+OF	1,4a \pm 0,3	1,0a \pm 0,2	1,1a \pm 0,1	1,0a \pm 0,2	1,2a \pm 0,2	1,2a \pm 0,4
S+Ox+OB	1,4a \pm 0,2	1,2a \pm 0,4	1,1a \pm 0,2	1,0a \pm 0,1	1,1a \pm 0,2	1,2a \pm 0,3

Del mismo modo, la aplicación de cada bioestimulante experimental ocasionó una significativa estimulación de la actividad deshidrogenasa ($p < 0,05$) durante los primeros días de incubación. Así, fue a los 5 primeros días del periodo experimental cuando se observó la máxima estimulación de la actividad deshidrogenasa en los suelos enmendados con OB y OF. Con respecto al tratamiento S, la actividad deshidrogenasa aumentó un 86% para el tratamiento S+OF y un 77% para el tratamiento S+OB. Esta estimulación fue disminuyendo de forma progresiva, de tal forma que al final del periodo experimental, la actividad deshidrogenasa de los suelos enmendados orgánicamente fue similar a la obtenida para el suelo control (tabla 32).

Cuando se aplicaron los dos bioestimulantes experimentales en el suelo contaminado con oxifluorfén se observó también una disminución de la actividad deshidrogenasa con respecto a los suelos enmendados orgánicamente y no contaminados (tabla 32). Sin embargo, esta inhibición fue menor con respecto a los suelos contaminados y no enmendados orgánicamente. Del mismo modo, se observa durante los primeros días de incubación cómo el tipo de bioestimulante experimental influyó de forma significativa en los valores de dicha actividad enzimática. No obstante, al final del periodo de incubación los valores de los tratamientos S+Ox+OF y S+Ox+OB fueron similares a los del tratamiento S+Ox.

Al igual que la actividad deshidrogenasa, la aplicación de oxifluorfén al suelo provocó una inhibición significativa ($p < 0,05$) de la actividad ureasa. Esta inhibición se mantuvo durante los 90 días experimentales, de tal forma que al final de dicho tiempo y comparado con el tratamiento S, la actividad ureasa significativamente ($p < 0,05$) disminuyó un 54,2% en el tratamiento S+Ox (tabla 32).

Por otro lado, y a diferencia de la actividad deshidrogenasa, la actividad ureasa no se estimuló cuando se añadieron ambos bioestimulantes, manteniendo valores muy similares a los del tratamiento S (Tabla XX). También, en los suelos contaminados con el herbicida se observaron valores de la actividad ureasa muy similares a los obtenidos para los suelos contaminados y sin enmendar orgánicamente.

La tabla 33 muestra la evolución de las actividades enzimáticas β -glucosidasa y fosfatasa en suelos enmendados con los bioestimulantes experimentales y contaminados con oxifluorfén durante el periodo de incubación. A igual que para las dos enzimas anteriores, tanto la actividad β -glucosidasa como la actividad fosfatasa se inhibieron en los suelos contaminados por oxifluorfén. Esta inhibición se mantuvo

durante los 90 días de incubación. Así, comparado con el tratamiento S y al final del periodo de incubación, las actividades β -glucosidasa y fosfatasa significativamente ($p < 0,05$) disminuyeron un 29,6 % y un 45,4% en el tratamiento S+Ox.

Del mismo modo, la aplicación de los dos bioestimulantes experimentales al suelo no contaminado causó una estimulación significativa ($p < 0,05$) de ambas actividades enzimáticas durante los 20 primeros días de incubación, alcanzando su máxima estimulación a los 5 días en donde la actividad β -glucosidasa aumentó un 73,3% y 80,8% en los tratamientos S+OF y S+OB (comparado con el tratamiento) y la actividad fosfatasa aumentó un 82,1% y 89,1% en los tratamientos S+OF y S+OB (comparado con el tratamiento) (tabla 33).

Cuando se aplicaron los dos bioestimulantes experimentales en el suelo contaminado con oxifluorfén se observó también una disminución de las actividades β -glucosidasa y fosfatasa con respecto a los suelos enmendados orgánicamente y no contaminados (tabla 33). Sin embargo, y al igual que para la actividad deshidrogenasa, esta inhibición fue menor con respecto a los suelos contaminados y no enmendados orgánicamente. También se observa durante los primeros días de incubación cómo el tipo de bioestimulante experimental influyó de forma significativa en los valores de dicha actividad enzimática. No obstante, al final del periodo de incubación los valores de los tratamientos S+Ox+OF y S+Ox+OB fueron similares a los del tratamiento S+Ox.

La figura 24 muestra la evolución del herbicida oxifluorfén durante el periodo experimental. Como se puede observar, la concentración del herbicida fue disminuyendo de forma progresiva durante los 90 días de incubación, de tal forma que al final del periodo experimental la concentración de oxifluorfén había descendido un 45 % para el tratamiento S+Ox+OF y un 34,5 % para el tratamiento S+Ox+OB respecto al día 5 de incubación. La aplicación de los bioestimulantes en el suelo contaminado aumentó la degradación de dicho herbicida, haciendo disminuir significativamente su concentración en suelo. Sin embargo, el tipo de bioestimulante influyó en esta degradación, ya que al final de los 90 días de incubación la concentración de oxifluorfén había descendido un 34,5 % y 24,4 % en los tratamientos S+Ox+OF y S+Ox+OB respecto al tratamiento S+Ox.

TABLA 33: EVOLUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES B-GLUCOSIDASA Y FOSFATASA (MEDIA ± ERROR ESTÁNDAR, N = 3) EN SUELOS ENMENDADOS CON LOS BIOESTIMULANTES EXPERIMENTALES Y CONTAMINADOS CON OXIFLUORFÉN DURANTE EL PERIODO DE INCUBACIÓN. COLUMNAS CON LA MISMA LETRA(S) NO PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P>0,05). PNP: P-NITROFENOL.

	Días de incubación					
	5	10	20	35	55	90
Actividad β -glucosidasa (mmol PNP g ⁻¹ h ⁻¹)						
S	0,48b ± 0,11	0,52b ± 0,11	0,58b ± 0,17	0,53b ± 0,13	0,55b ± 0,18	0,54b ± 0,15
S+OF	1,8c ± 0,2	1,3c ± 0,2	1,0c ± 0,1	0,48b ± 0,11	0,50b ± 0,14	0,52b ± 0,18
S+OB	2,5d ± 0,3	1,9c ± 0,2	1,7c ± 0,3	0,51b ± 0,15	0,52b ± 0,10	0,54b ± 0,11
S+Ox	0,29a ± 0,06	0,34a ± 0,10	0,26a ± 0,09	0,32a ± 0,10	0,31a ± 0,08	0,38a ± 0,10
S+Ox+OF	1,2c ± 0,1	0,86b ± 0,11	0,74b ± 0,14	0,49b ± 0,11	0,48b ± 0,09	0,53b ± 0,12
S+Ox+OB	1,4c ± 0,2	1,0c ± 0,1	0,72b ± 0,12	0,46b ± 0,10	0,45ab ± 0,13	0,42ab ± 0,11
Actividad fosfatasa (μ mol PNP g ⁻¹ h ⁻¹)						
S	3,3b ± 1,0	3,5b ± 1,2	3,4b ± 0,97	3,3b ± 1,1	3,1b ± 1,0	3,3b ± 1,1
S+OF	18,4d ± 2,2	8,0c ± 2,3	6,1c ± 1,8	3,3b ± 1,2	3,4b ± 1,2	3,1b ± 1,2
S+OB	30,3e ± 2,9	10,2c ± 2,5	5,9b ± 1,4	3,2b ± 1,0	3,2b ± 0,98	3,1b ± 1,1
S+Ox	1,8a ± 0,87	1,6a ± 0,59	1,7a ± 0,66	1,8a ± 0,89	1,9a ± 0,49	1,8a ± 0,88
S+Ox+OF	10,3c ± 1,6	8,2c ± 1,3	6,6c ± 1,5	3,7b ± 1,0	2,4a ± 0,81	2,3a ± 0,77
S+Ox+OB	14,7cd ± 1,8	10,0c ± 1,5	6,8c ± 1,2	3,6b ± 1,2	2,5a ± 0,84	2,2a ± 0,94

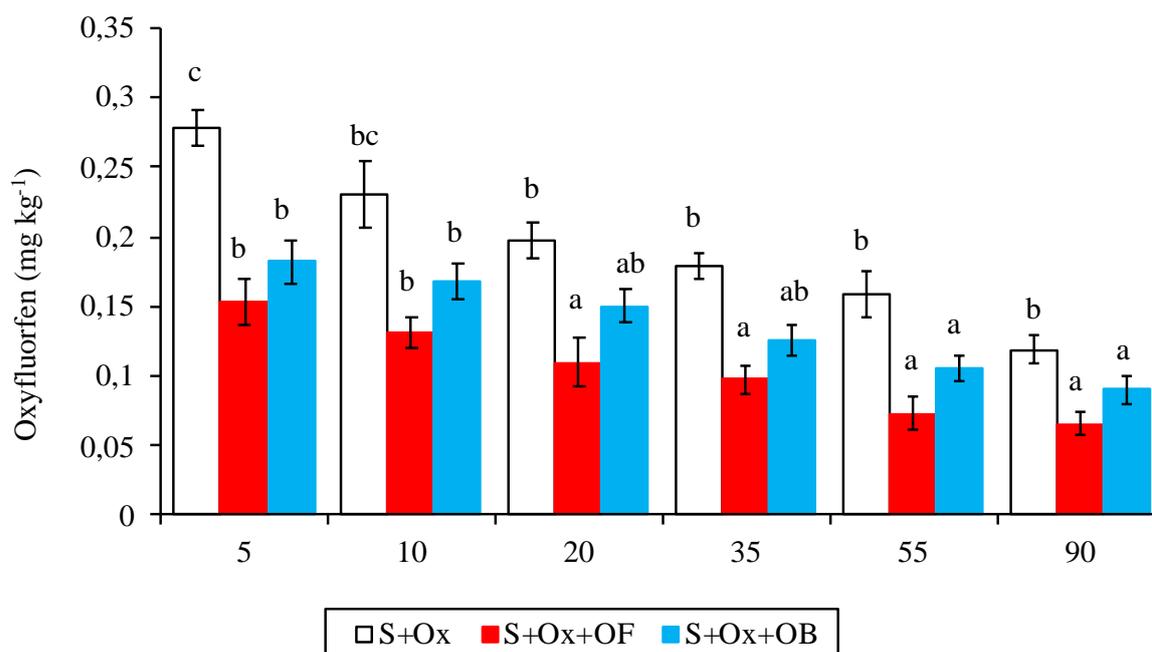


FIGURA 24: EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN OXIFLUORFÉN (MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR, N = 3) EN SUELOS NO ENMENDADOS Y ENMENDADOS CON LOS DOS BIOESTIMULANTES EXPERIMENTALES. COLUMNAS CON LA MISMA LETRA(S) NO PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p > 0,05$).

La tabla 35 muestra la evolución de la comunidad microbiana (bacterias y hongos) durante los 90 días de incubación.

Cuando los bioestimulantes experimentales se aplicaron al suelo se observó una importante estimulación tanto en la población bacteriana como fúngica del suelo durante los 10 primeros días de incubación. En este sentido y comparado con el tratamiento S10, la población de bacterias Gram⁺ significativamente ($p < 0,05$) aumentó un 60,2% para el tratamiento S+OF10 y un 61,1% para el tratamiento S+OB10. Del mismo modo, la población de bacterias Gram⁻ significativamente ($p < 0,05$) aumentó un 61,8% para el tratamiento S+OF10 y un 62,9% para el tratamiento S+OB10, mientras que la población de hongos significativamente ($p < 0,05$) aumentó un 41,4% para el tratamiento S+OF10 y un 43,3% para el tratamiento S+OB10. Posteriormente, la población de dichas bacterias y hongos fue disminuyendo progresivamente durante el periodo de incubación, de tal manera que al final de los 90 días, la población de bacterias y hongos era similar entre los tratamientos S, S+OF y S+OB.

Cuando el herbicida oxifluorfen se aplicó al suelo, la población total de bacterias y hongos significativamente ($p < 0,05$) disminuyó (tabla 34). Así, a los 10 primeros días de incubación y comprado con el tratamiento S10, en el tratamiento S+OX10 la

población de bacterias Gram⁺ significativamente ($p < 0,05$) disminuyó un 55,6%, la población de bacterias Gram⁻ significativamente ($p < 0,05$) disminuyó un 57,7% y la población fúngica disminuyó un 59,4%. Al final del periodo experimental, la población de bacterias y hongos también siguió inhibida en una proporción muy similar a los valores dados para el día 10 de incubación.

Por último, la aplicación de los bioestimulantes en el suelo contaminado mostró una población microbiana del suelo muy similar a la obtenida para el suelo contaminado y sin enmendar orgánicamente (tabla 34).

TABLA 34: EVOLUCIÓN DE BACTERIAS GRAM⁺, GRAM⁻, BACTERIAS TOTALES PLFAs Y HONGOS PLFAs (NG G⁻¹) (MEDIA ± ERROR ESTÁNDAR, N = 3) PARA LOS TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES A LOS 10 Y 90 DÍAS DE INCUBACIÓN. COLUMNAS CON LA MISMA LETRA(S) NO PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P > 0,05).

	bacGram ⁺	bacGram ⁻	Bacterias totales PLFAs	Hongos PLFAs
S10	14,4b ± 1,3	2,6b ± 0,5	17,0b ± 1,7	1,7b ± 0,3
S+OF10	36,2c ± 2,8	6,8c ± 1,1	43,0c ± 3,7	2,9c ± 0,6
S+OV10	37,0c ± 2,0	7,0c ± 1,4	44,0c ± 3,3	3,0c ± 0,8
S+Ox10	7,9a ± 1,1	1,4a ± 0,2	9,3a ± 1,4	0,69a ± 0,10
S+Ox+OF10	20,5b ± 2,9	3,7b ± 1,1	24,2b ± 3,9	0,82a ± 0,08
S+Ox+OV10	19,7b ± 2,4	4,0b ± 1,4	23,7b ± 3,9	0,89a ± 0,14
S90	14,2b ± 1,8	2,9b ± 0,9	17,1b ± 2,6	1,8b ± 0,1
S+OF90	14,8b ± 1,3	2,6b ± 0,7	17,4b ± 1,9	1,6b ± 0,2
S+OV90	15,1b ± 1,9	2,6b ± 0,5	17,5b ± 2,5	1,8b ± 0,2
S+Ox90	7,7a ± 1,2	1,3a ± 0,2	8,0a ± 1,5	0,72a ± 0,09
S+Ox+OF90	8,3a ± 1,8	1,2a ± 0,4	9,5a ± 2,3	0,91a ± 0,16
S+Ox+OB90	8,9a ± 2,0	1,1a ± 0,3	10,0a ± 2,2	0,92a ± 0,11

4.5. SEGUNDA EXPERIENCIA DE INCUBACIÓN

La tabla 36 muestra la evolución de la actividad deshidrogenasa en suelos enmendados con los bioestimulantes experimentales y contaminados con el herbicida imazamox durante el periodo de incubación. Los resultados indican que al igual que tras la contaminación con el herbicida oxifluorfen, la contaminación con imazamox causó durante todo el periodo de incubación una inhibición significativa ($p < 0,05$) de dicha actividad enzimática. Así, al final de dicho periodo experimental la actividad deshidrogenasa significativamente ($p < 0,05$) disminuyó un 43,2 %.

Al igual que la primera experiencia de incubación, la evolución de la actividad deshidrogenasa en los suelos no contaminados tras la aplicación de los dos

bioestimulantes experimentales fue similar, destacando una significativa estimulación de esta actividad enzimática durante los primeros días de incubación para luego ir disminuyendo de forma progresiva y alcanzar valores finales al tratamiento S al final del periodo de incubación. Del mismo, se observa que a los 5 días después de añadir ambos bioestimulantes un aumento significativo ($p < 0,05$) de la actividad deshidrogenasa del 37 % (tabla 35).

También, y al igual que para los estudios realizados con el herbicida oxifluorfen, al aplicar los dos bioestimulantes en el suelo contaminado con imazamox se observó una disminución de la actividad deshidrogenasa (tabla 35). Del mismo modo, esta inhibición fue menor con respecto a los suelos contaminados y no enmendados orgánicamente. También se observó que tras los 5 primeros días de incubación y la aplicación del bioestimulante OF en el suelo contaminado presentaba una mayor estimulación de dicha actividad enzimática (25 %) que tras la aplicación del bioestimulante OB, lo cual nos pone de manifiesto las diferencias de comportamiento de ambos bioestimulantes en el suelo contaminado.

Por último, también se observa durante los primeros días de incubación cómo el tipo de bioestimulante experimental influyó de forma significativa en los valores de la actividad deshidrogenasa (tabla 35). Al final del periodo de incubación los valores de los tratamientos S+I+OF y S+I+OB fueron similares a los del tratamiento S+I.

La aplicación de imazamox al suelo también causó una inhibición significativa ($p < 0,05$) de la actividad ureasa durante los 90 días de incubación, de tal forma que al final del periodo experimental la actividad ureasa significativamente ($p < 0,05$) disminuyó un 22,7 % con respecto al tratamiento S (tabla 35).

La aplicación de los bioestimulantes OF y OB al suelo no contaminado no causó ningún efecto (inhibición o estimulación) de la actividad ureasa del suelo, manteniendo durante todo el periodo de incubación valores de dicha actividad enzimática muy similares al suelo no contaminado y no enmendado orgánicamente (tabla 35).

TABLA 35: EVOLUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES DESHIDROGENASA Y UREASA (MEDIA ± ERROR ESTÁNDAR, N = 3) EN SUELOS ENMENDADOS CON LOS BIOESTIMULANTES EXPERIMENTALES Y CONTAMINADOS CON IMAZAMOX DURANTE EL PERIODO DE INCUBACIÓN. COLUMNAS CON LA MISMA LETRA(S) NO PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P>0,05). INTF: 2-P-iodo-3-NITROPHENYL FORMAZÁN.

	Días de incubación					
	5	10	20	35	55	90
Actividad deshidrogenasa ($\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$)						
S	4,5b ± 1,1	4,3b ± 1,1	4,4b ± 1,2	4,3b ± 1,3	4,5b ± 1,2	4,4b ± 0,8
S+OF	34,9e ± 1,9	20,0d ± 1,3	10,9c ± 1,3	4,4b ± 1,2	4,6b ± 1,4	4,3b ± 1,0
S+OB	22,0d ± 2,2	13,2c ± 2,0	8,4c ± 1,2	4,6b ± 1,3	4,5b ± 1,5	4,4b ± 1,2
S+I	2,4a ± 1,0	1,9a ± 0,39	1,8a ± 0,55	1,9a ± 0,48	2,2a ± 0,77	2,5a ± 0,61
S+I+OF	22,8d ± 3,1	10,9c ± 2,0	4,8b ± 1,0	4,4b ± 0,98	2,2a ± 0,82	2,4a ± 0,94
S+I+OB	17,1 c ± 2,5	9,1c ± 1,6	4,7b ± 1,2	4,5b ± 1,3	2,2a ± 0,68	2,6a ± 0,88
Actividad ureasa ($\mu\text{g NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$)						
S	2,4b ± 0,6	2,2b ± 0,5	2,0b ± 0,4	2,2b ± 0,3	2,1b ± 0,6	2,2b ± 0,4
S+OF	2,6b ± 0,8	2,4b ± 0,4	2,2b ± 0,4	2,4b ± 0,4	2,3b ± 0,5	2,5b ± 0,5
S+OB	2,5b ± 0,5	2,4b ± 0,5	2,1b ± 0,5	2,3b ± 0,4	2,2b ± 0,5	2,4b ± 0,6
S+I	1,3a ± 0,3	1,2a ± 0,2	1,3a ± 0,3	1,4a ± 0,2	1,6a ± 0,3	1,7a ± 0,3
S+I+OF	1,4a ± 0,4	1,5a ± 0,2	1,3a ± 0,2	1,5a ± 0,4	1,7a ± 0,5	1,6a ± 0,5
S+I+OB	1,3a ± 0,3	1,3a ± 0,3	1,4a ± 0,2	1,5a ± 0,3	1,6a ± 0,3	1,26a ± 0,4

TABLA 36: EVOLUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES B-GLUCOSIDASA Y FOSFATASA (MEDIA ± ERROR ESTÁNDAR, N = 3) EN SUELOS ENMENDADOS CON LOS BIOESTIMULANTES EXPERIMENTALES Y CONTAMINADOS CON IMAZAMOX DURANTE EL PERIODO DE INCUBACIÓN. COLUMNAS CON LA MISMA LETRA(S) NO PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P>0,05). PNP: P-NITROFENOL.

	Días de incubación					
	5	10	20	35	55	90
Actividad β-glucosidasa (mmol PNP g ⁻¹ h ⁻¹)						
S	0,50b ± 0,10	0,54b ± 0,15	0,55b ± 0,11	0,50b ± 0,12	0,53b ± 0,12	0,52b ± 0,11
S+OF	2,0c ± 0,3	1,4c ± 0,3	0,91b ± 0,18	0,46 ± 0,13	0,54b ± 0,12	0,54b ± 0,11
S+OB	2,7c ± 0,4	2,2c ± 0,4	1,5c ± 0,3	0,53b ± 0,17	0,51b ± 0,11	0,56b ± 0,14
S+I	0,26a ± 0,09	0,25a ± 0,08	0,37a ± 0,10	0,40a ± 0,12	0,38a ± 0,10	0,40a ± 0,11
S+I+OF	1,2c ± 0,1	0,81b ± 0,14	0,62b ± 0,11	0,48b ± 0,09	0,47 ± 0,11	0,52b ± 0,12
S+I+OB	1,3c ± 0,1	0,97b ± 0,16	0,72b ± 0,13	0,52b ± 0,10	0,50 ± 0,14	0,50b ± 0,10
Actividad fosfatasa (μmol PNP g ⁻¹ h ⁻¹)						
S	3,4b ± 1,0	3,5 b ± 1,2	3,4b ± 0,97	3,3b ± 1,1	3,1b ± 1,0	3,3b ± 1,1
S+OF	18,4d ± 2,2	8,0c ± 2,3	6,1b ± 1,8	3,3b ± 1,2	3,4b ± 1,2	3,1b ± 1,2
S+OB	30,3e ± 2,9	10,2c ± 2,5	5,9b ± 1,4	3,2b ± 1,0	3,2b ± 0,98	3,1b ± 1,1
S+I	2,0a ± 0,89	1,9a ± 0,57	1,8a ± 0,92	1,8a ± 0,76	1,7a ± 0,82	1,8a ± 0,91
S+I+OF	12,4c ± 2,0	9,1c ± 1,6	7,4bc ± 1,8	4,3b ± 1,3	2,8ab ± 1,0	2,6ab ± 0,88
S+I+OB	21,7d ± 2,3	10,6c ± 1,8	7,0bc ± 1,5	4,2b ± 1,2	2,7ab ± 0,75	2,7ab ± 0,93

De la misma forma, en los suelos contaminados con imazamox se observaron valores de la actividad ureasa muy similares a los obtenidos para los suelos contaminados y sin enmendar orgánicamente (tabla 35).

Respecto a las actividades enzimáticas β -glucosidasa y fosfatasa se observó que la aplicación al suelo no enmendado del herbicida imazamox causó una inhibición significativa ($p < 0,05$) de ambas enzimas durante el periodo experimental (tabla 36). Así, al final del periodo de incubación y comparado con el tratamiento S, las actividades β -glucosidasa y fosfatasa significativamente ($p < 0,05$) disminuyeron un 23,1% y un 45,5% en el tratamiento S+I.

Al igual que para la primera experiencia de incubación, la aplicación de los dos bioestimulantes experimentales al suelo no contaminado causó una estimulación significativa ($p < 0,05$) de ambas actividades enzimáticas durante los 20 primeros días de incubación, alcanzando su máxima estimulación a los 5 días en donde la actividad β -glucosidasa aumentó un 75% y 81,5% en los tratamientos S+OF y S+OB (comparado con el tratamiento) y la actividad fosfatasa aumentó un 81,5% y 88,8% en los tratamientos S+OF y S+OB (comparado con el tratamiento) (tabla 36).

Tras la aplicación al suelo contaminado con imazamox de los dos bioestimulantes experimentales también se observó una inhibición de las actividades β -glucosidasa y fosfatasa con respecto a los suelos enmendados orgánicamente y no contaminados (tabla 36). Sin embargo, y al igual que ocurría en el caso del oxifluorfén, esta inhibición fue menor con respecto a los suelos contaminados y no enmendados orgánicamente. También se observa durante los primeros días de incubación cómo el tipo de bioestimulante experimental influyó de forma significativa en los valores de dicha actividad enzimática. Al final del periodo de incubación los valores de los tratamientos S+I+OF y S+I+OB fueron similares a los del tratamiento S+I.

La figura 25 muestra la evolución de imazamox durante el periodo de incubación. En este caso, la concentración de imazamox también disminuyó progresivamente a lo largo del periodo experimental, de tal forma que al final del periodo experimental la concentración del herbicida había descendido un 19,4% en el tratamiento S+I+OF y un 30,5% en el tratamiento S+I+OB respecto al día 5 de incubación. Al igual que sucede con el oxifluorfén, la aplicación de los bioestimulantes en el suelo contaminado aumentó la degradación de imazamox, haciendo también disminuir significativamente su concentración en suelo. También, el tipo de

bioestimulante influyó en esta degradación, ya que al final de los 90 días de incubación la concentración de imazamox había descendido un 52,6% y 68,4% en los tratamientos S+I+OF y S+I+OB respecto al tratamiento S+I.

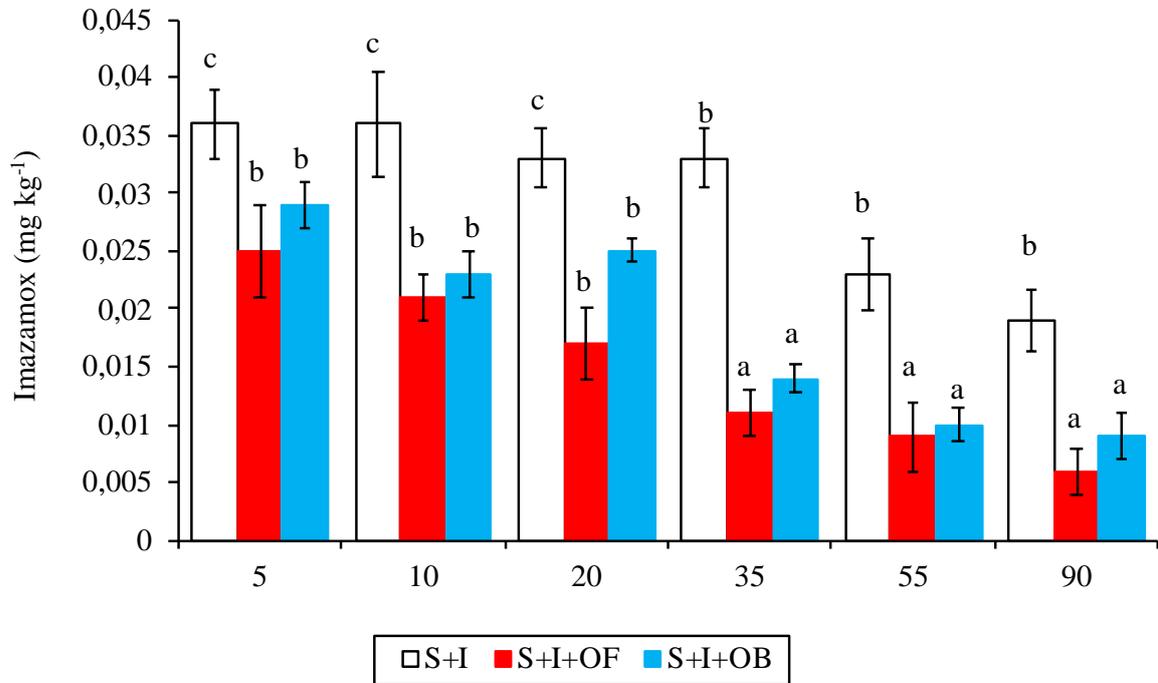


FIGURA 25: EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN IMAZAMOX (MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR, N = 3) EN SUELOS NO ENMENDADOS Y ENMENDADOS CON LOS DOS BIOESTIMULANTES EXPERIMENTALES. COLUMNAS CON LA MISMA LETRA(S) NO PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p > 0,05$).

La aplicación de los bioestimulantes experimentales significativamente ($p < 0,05$) estimularon la población de bacterias y hongos del suelo durante los 10 primeros días de incubación. En este sentido y comparado con el tratamiento S10, la población de bacterias Gram⁺ aumentó significativamente ($p < 0,05$) un 61% para el tratamiento S+OF10 y un 61,5% para el tratamiento S+OB10 (tabla 37). Del mismo modo, la población de bacterias Gram⁻ significativamente ($p < 0,05$) aumentó un 54% para el tratamiento S+OF10 y un 53,2% para el tratamiento S+OB10, mientras que la población de hongos aumentó significativamente ($p < 0,05$) un 36,4% para el tratamiento S+OF10 y un 34,4% para el tratamiento S+OB10. Al igual que ocurría en la primera experiencia, la población bacteriana y fúngica del suelo fue disminuyendo progresivamente durante el periodo de incubación, de tal manera que al final de dicho

periodo, la población de bacterias y hongos era similar entre los tratamientos S, S+OF y S+OB.

TABLA 37: EVOLUCIÓN DE BACTERIAS GRAM⁺, GRAM⁻, BACTERIAS TOTALES PLFAs Y HONGOS PLFAs (NG G⁻¹) (MEDIA ± ERROR ESTÁNDAR, N = 3) PARA LOS TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES A LOS 10 Y 90 DÍAS DE INCUBACIÓN. COLUMNAS CON LA MISMA LETRA(S) NO PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P>0,05).

	bacGram ⁺	bacGram ⁻	Bacterias totales PLFAs	Hongos PLFAs
S10	13,9b ± 1,5	2,9b ± 0,8	16,8b ± 2,4	2,1b ± 0,8
S+OF10	35,6c ± 2,4	6,3c ± 1,7	41,9c ± 4,0	3,3c ± 1,0
S+OB10	36,1c ± 1,9	6,2c ± 1,3	42,3c ± 3,4	3,2c ± 0,7
S+I10	6,2a ± 1,6	1,2a ± 0,1	7,4a ± 1,4	0,89a ± 0,10
S+I+OF10	13,7b ± 2,7	4,0b ± 0,9	17,7b ± 3,3	0,98a ± 0,15
S+I+OB10	14,8b ± 2,2	3,8b ± 1,0	18,6b ± 3,1	0,92a ± 0,13
S90	13,6b ± 1,7	3,1b ± 0,6	16,7b ± 2,1	2,0b ± 0,6
S+OF90	13,1b ± 1,2	3,0b ± 1,0	16,1b ± 2,1	1,8b ± 0,3
S+OB90	14,0b ± 1,8	3,2b ± 0,8	17,2b ± 2,7	1,9b ± 0,2
S+I90	8,5ab ± 1,4	1,6a ± 0,3	9,1a ± 1,6	0,79a ± 0,10
S+I+OF90	8,0ab ± 1,7	2,8b ± 0,8	11,8ab ± 2,4	1,0a ± 0,1
S+I+OB90	8,1ab ± 1,3	2,5b ± 0,5	10,6ab ± 1,4	1,2a ± 0,2

Cuando el herbicida imazamox se aplicó al suelo, la población total de bacterias y hongos disminuyó significativamente ($p < 0,05$) (tabla 37). Así, a los 10 primeros días de incubación y comparado con el tratamiento S10, en el tratamiento S+I10 la población de bacterias disminuyó significativamente ($p < 0,05$) un 64,3% y la población de hongos disminuyó un 57,6%. También, al final del periodo experimental y comparado con el tratamiento S90, la población de bacterias y hongos en el tratamiento S+I90 siguió inhibida en una proporción muy similar a los valores dados para el día 10 de incubación.

Por último, la aplicación de los bioestimulantes en el suelo contaminado disminuyó la inhibición de la población microbiana del suelo. En este sentido y al final del periodo experimental, la población total de bacterias y hongos fue muy similar a la del suelo contaminado y no enmendado orgánicamente (tabla 37).

4.6. TERCERA EXPERIENCIA DE INCUBACIÓN

Al igual que ocurre con los herbicidas anteriores, la aplicación del herbicida diurón ocasionó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la actividad de la deshidrogenasa del suelo a lo largo de todo el período de incubación (tabla 38). Al final de los 90 días de incubación y en comparación con el suelo no contaminado y no enmendado orgánicamente, la actividad deshidrogenasa disminuyó significativamente ($p < 0,05$) un 42,6%.

El comportamiento de los bioestimulantes experimentales fue similar al de los dos experimentos anteriores, destacan una estimulación significativa ($p < 0,05$) de la actividad deshidrogenasa durante los primeros días de incubación. Esta estimulación disminuye de forma progresiva durante el periodo experimental, de tal forma que al final de los 90 días de incubación la actividad deshidrogenasa de los suelos enmendados orgánicamente fue similar a la obtenida para el suelo control (tabla 38).

Al igual que para los dos herbicidas anteriores, cuando se aplicaron los dos bioestimulantes experimentales en el suelo contaminado con diurón se observó también una inhibición de la actividad deshidrogenasa con respecto a los suelos enmendados orgánicamente y no contaminados (tabla 38). No obstante, esta inhibición fue menor con respecto a los suelos contaminados y no enmendados orgánicamente. De la misma forma, también se observa durante los primeros días de incubación cómo el tipo de bioestimulante experimental influyó de forma significativa en los valores de dicha actividad enzimática observándose que tras los 5 primeros días de incubación y la aplicación del bioestimulante OF en el suelo contaminado presentaba una mayor estimulación de dicha actividad enzimática (31,5 %) que tras la aplicación del bioestimulante OB. Al igual que en los experimentos anteriores, al final del periodo de incubación los valores de los tratamientos S+D+OF y S+D+OB fueron similares a los del tratamiento S+D.

A diferencia del comportamiento de oxifluorfén e imazamox en el suelo, tras la aplicación de diurón al suelo no enmendado no causó ningún efecto sobre la actividad ureasa. Los valores de dicha actividad enzimática para el tratamiento S fueron similares a los del tratamiento S+D durante todo el periodo de incubación (tabla 38).

De la misma forma, la aplicación de los bioestimulantes experimentales no influyeron sobre los valores de la actividad ureasa con respecto al tratamiento S.

Igualmente, los valores de los tratamientos S+D+OF y S+D+OB tampoco sufrieron cambios a lo largo del periodo experimental con respecto al tratamiento S (tabla 38).

Las actividades enzimáticas β -glucosidasa y fosfatasa tuvieron un comportamiento similar al observado para las experiencias anteriores con oxifluorfén e imazamox (tabla 39). Así, la aplicación de diurón al suelo no enmendado causó una inhibición significativa ($p < 0,05$) de ambas enzimas durante el periodo experimental. Así, al final del periodo de incubación y comparado con el tratamiento S, las actividades β -glucosidasa y fosfatasa significativamente ($p < 0,05$) disminuyeron un 30,4 % y un 60,6% en el tratamiento S+D.

Al igual que para las dos experiencias de incubación, la aplicación de los dos bioestimulantes experimentales al suelo no contaminado causó una estimulación significativa ($p < 0,05$) de ambas actividades enzimáticas durante los 20 primeros días de incubación, alcanzando su máxima estimulación a los 5 días en donde la actividad β -glucosidasa aumentó un 67,6% y 81,0% en los tratamientos S+OF y S+OB (comparado con el tratamiento) y la actividad fosfatasa aumentó un 82,1% y 89,1% en los tratamientos S+OF y S+OB (comparado con el tratamiento) (Tabla 39).

Al aplicar diurón los dos bioestimulantes al suelo contaminado con diurón también se observó una inhibición de las actividades β -glucosidasa y fosfatasa con respecto a los suelos enmendados orgánicamente y no contaminados (tabla 39). Al igual que ocurría para la actividad deshidrogenasa, esta inhibición fue menor con respecto a los suelos contaminados y no enmendados orgánicamente. También se observa durante los primeros días de incubación cómo el tipo de bioestimulante experimental influyó de forma significativa en los valores de dicha actividad enzimática. Al final del periodo de incubación los valores de los tratamientos S+D+OF y S+D+OB fueron similares a los del tratamiento S+D.

La concentración de diurón en el suelo sin enmendar orgánicamente también disminuyó de forma progresiva a lo largo del periodo experimental (figura 26). La aplicación de los bioestimulantes experimentales aumentó la degradación del herbicida en suelo, de tal forma que al final de los 90 días de incubación la concentración de oxifluorfén había descendido un 77,3 % y 59,2 en los tratamientos S+D+OF y S+D+OB respecto al tratamiento S+D, poniendo de manifiesto nuevamente el comportamiento diferente de ambos bioestimulantes con el diurón.

TABLA 38: EVOLUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES DESHIDROGENASA Y UREASA (MEDIA ± ERROR ESTÁNDAR, N = 3) EN SUELOS ENMENDADOS CON LOS BIOESTIMULANTES EXPERIMENTALES Y CONTAMINADOS CON DIURÓN DURANTE EL PERIODO DE INCUBACIÓN. COLUMNAS CON LA MISMA LETRA(S) NO PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P>0,05). INTF: 2-P-iodo-3-NITROPHENYL FORMAZÁN.

	Días de incubación					
	5	10	20	35	55	90
Actividad deshidrogenasa ($\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$)						
S	4,9b ± 1,2	4,8b ± 1,1	4,6b ± 1,3	4,9b ± 1,4	4,6b ± 0,8	4,7b ± 1,3
S+OF	32,8e ± 1,9	24,7d ± 2,2	11,3c ± 2,1	5,1b ± 1,3	4,6b ± 1,2	4,8b ± 1,6
S+OB	21,7d ± 2,2	12,0c ± 1,7	6,9c ± 0,9	4,6b ± 1,1	4,7b ± 1,1	4,7b ± 1,3
S+D	2,5a ± 0,96	1,9a ± 0,59	2,0a ± 0,66	2,1a ± 0,89	2,6a ± 0,96	2,7a ± 0,75
S+D+OF	25,4d ± 2,4	21,4d ± 2,1	9,4c ± 2,0	4,4b ± 1,2	4,5b ± 1,9	4,2b ± 1,5
S+D+OB	17,4c ± 2,8	10,7c ± 2,0	8,3c ± 1,7	4,5b ± 1,0	4,3b ± 1,3	4,4b ± 1,2
Actividad ureasa ($\mu\text{g NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$)						
S	2,2a ± 0,5	2,3a ± 0,3	2,3a ± 0,5	2,1a ± 0,4	2,4a ± 0,3	2,5a ± 0,4
S+OF	2,4a ± 0,4	2,4a ± 0,5	2,2a ± 0,3	2,2a ± 0,3	2,2a ± 0,4	2,4a ± 0,4
S+OB	2,4a ± 0,4	2,3a ± 0,3	2,4a ± 0,3	2,2a ± 0,4	2,3a ± 0,4	2,4a ± 0,5
S+D	2,2a ± 0,3	2,1a ± 0,3	2,3a ± 0,2	2,3a ± 0,4	2,2a ± 0,2	2,2a ± 0,4
S+D+OF	2,3a ± 0,5	2,4a ± 0,3	2,1a ± 0,3	2,2a ± 0,3	2,3a ± 0,3	2,1a ± 0,3
S+D+OB	2,2a ± 0,4	2,3a ± 0,4	2,1a ± 0,3	2,1a ± 0,4	2,1a ± 0,2	2,3a ± 0,3

TABLA 39: EVOLUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES B-GLUCOSIDASA Y FOSFATASA (MEDIA ± ERROR ESTÁNDAR, N = 3) EN SUELOS ENMENDADOS CON LOS BIOESTIMULANTES EXPERIMENTALES Y CONTAMINADOS CON DIURÓN DURANTE EL PERIODO DE INCUBACIÓN. COLUMNAS CON LA MISMA LETRA(S) NO PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P>0,05). PNP: P-NITROFENOL.

	Días de incubación					
	5	10	20	35	55	90
Actividad β-glucosidasa (mmol PNP g ⁻¹ h ⁻¹)						
S	0,55b ± 0,15	0,55 ± 0,12	0,53 ± 0,12	0,56 ± 0,14	0,55 ± 0,10	0,56 ± 0,13
S+OF	1,7c ± 0,3	1,1c ± 0,3	0,89b ± 0,17	0,54b ± 0,13	0,55b ± 0,15	0,56b ± 0,14
S+OB	2,9d ± 0,3	2,1c ± 0,4	1,8c ± 0,4	0,55b ± 0,10	0,56b ± 0,13	0,57b ± 0,15
S+D	0,32a ± 0,10	0,34a ± 0,09	0,37a ± 0,08	0,36a ± 0,10	0,35a ± 0,09	0,39a ± 0,10
S+D+OF	1,1c ± 0,1	0,88b ± 0,16	0,76b ± 0,14	0,57b ± 0,10	0,56b ± 0,12	0,52b ± 0,12
S+D+OB	1,3c ± 0,2	1,1c ± 0,1	0,85b ± 0,16	0,53b ± 0,12	0,52b ± 0,13	0,55b ± 0,14
Actividad fosfatasa (μmol PNP g ⁻¹ h ⁻¹)						
S	3,3b ± 1,0	3,5b ± 1,2	3,4b ± 0,97	3,3b ± 1,1	3,1b ± 1,0	3,3b ± 1,1
S+OF	18,4d ± 2,2	8,0c ± 2,3	6,1bc ± 1,8	3,3b ± 1,2	3,4b ± 1,2	3,1b ± 1,2
S+OB	30,3e ± 2,9	10,2c ± 2,5	5,9bc ± 1,4	3,2b ± 1,0	3,2b ± 0,98	3,1b ± 1,1
S+D	2,2ab ± 0,94	1,8a ± 0,89	1,4a ± 0,95	1,4a ± 0,88	1,5a ± 0,70	1,3a ± 0,81
S+D+OF	11,0cd ± 1,5	7,2c ± 1,5	6,2c ± 1,4	4,6b ± 1,4	3,4b ± 1,3	2,3ab ± 0,89
S+D+OB	14,5d ± 1,8	7,6c ± 1,2	6,2c ± 1,2	4,5b ± 1,1	3,3b ± 1,0	2,2ab ± 0,77

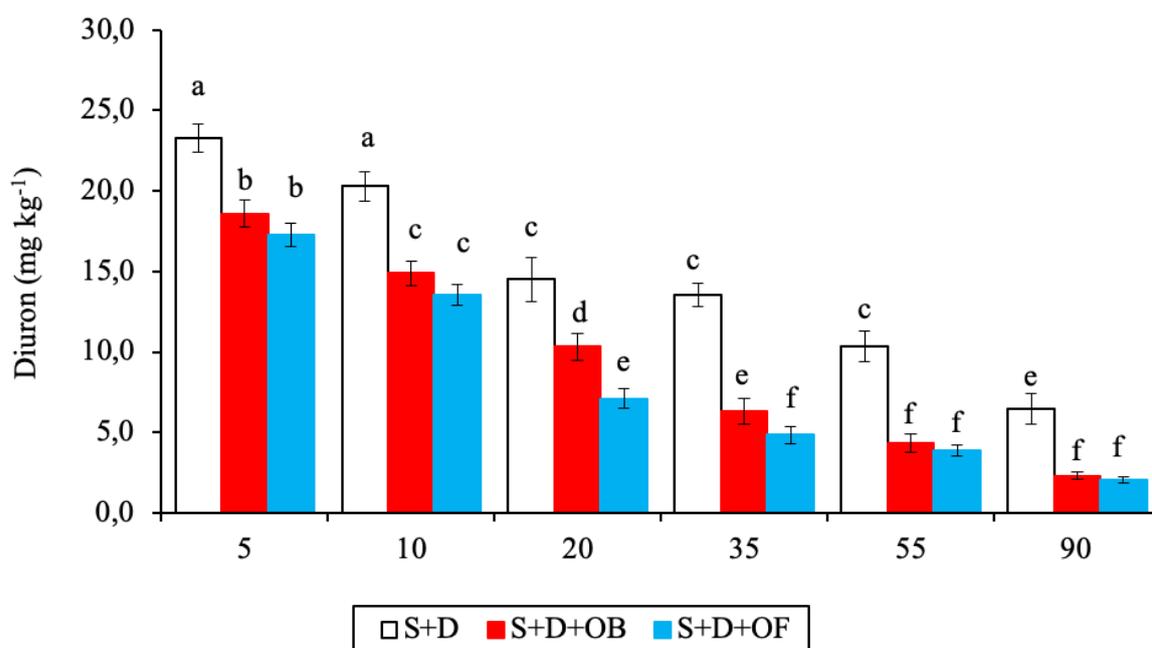


FIGURA 26: EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN DIURÓN (MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR, N = 3) EN SUELOS NO ENMENDADOS Y ENMENDADOS CON LOS DOS BIOESTIMULANTES EXPERIMENTALES. COLUMNAS CON LA MISMA LETRA(S) NO PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p > 0,05$).

Como era de esperar, y al igual que en las dos experiencias de incubación anteriores, la aplicación de los dos bioestimulantes estimuló significativamente ($p < 0,05$) la población de bacterias y hongos del suelo durante los 10 primeros días de incubación. En este sentido y comparado con el tratamiento S10, la población de bacterias aumentó significativamente ($p < 0,05$) un 59,1% para el tratamiento S+OF10 y un 59,2% para el tratamiento S+OB10. Del mismo modo, la población de hongos significativamente ($p < 0,05$) aumentó un 36,7% para el tratamiento S+OF10 y un 42,4% para el tratamiento S+OB10 (tabla 40). Al igual que ocurría en las dos experiencias de incubación anteriormente comentadas, la población de bacterias y hongos del suelo disminuyó de forma progresiva durante el periodo experimental, de tal forma que al final de los 90 días de incubación, la población de bacterias y hongos era similar entre los tratamientos S, S+OF y S+OB (tabla 40).

Cuando el herbicida diurón se aplicó al suelo, la población total de bacterias y hongos significativamente ($p < 0,05$) disminuyó (tabla 40). Así, a los 10 primeros días de incubación y comparado con el tratamiento S10, en el tratamiento S+D10 la población de bacterias Gram⁺ significativamente ($p < 0,05$) disminuyó un 58,2%, la población de bacterias Gram⁻ significativamente ($p < 0,05$) disminuyó un 41,7% y la

población de hongos disminuyó un 67,4%. También, al final del periodo experimental y comparado con el tratamiento S90, en el tratamiento S+D90 la población de bacterias Gram⁺ significativamente ($p < 0,05$) disminuyó un 55,1%, la población de bacterias Gram⁻ significativamente ($p < 0,05$) disminuyó un 51,9% y la población de hongos disminuyó un 66,7% (tabla 40).

Por último, la aplicación de los bioestimulantes en el suelo contaminado con diurón fue muy similar a la del suelo contaminado con diurón sin enmendado orgánicamente (tabla 40).

TABLA 40: EVOLUCIÓN DE BACTERIAS GRAM⁺, GRAM⁻, BACTERIAS TOTALES PLFAs Y HONGOS PLFAs (NG G⁻¹) (MEDIA ± ERROR ESTÁNDAR, N = 3) PARA LOS TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES A LOS 10 Y 90 DÍAS DE INCUBACIÓN. COLUMNAS CON LA MISMA LETRA(S) NO PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P>0,05).

	bacGram ⁺	bacGram ⁻	Bacterias totales PLFAs	Hongos PLFAs
S10	15,3b ± 1,8	2,4b ± 0,7	17,7a ± 2,3	1,9b ± 0,4
S+OF10	37,3d ± 2,3	6,0c ± 1,4	43,3d ± 3,8	3,0c ± 0,6
S+OB10	38,1d ± 2,0	6,3c ± 1,9	43,4d ± 3,7	3,3c ± 0,9
S+D10	7,7a ± 1,1	1,6a ± 0,2	9,3a ± 1,3	0,62a ± 0,10
S+D+OF10	20,7c ± 1,7	4,9b ± 1,0	25,6c ± 2,5	0,88a ± 0,14
S+D+OB10	20,5c ± 1,5	5,3c ± 1,3	25,8c ± 2,7	0,82a ± 0,17
S90	15,6b ± 1,4	2,7b ± 0,4	18,3b ± 1,6	1,8b ± 0,3
S+OF90	15,9b ± 1,6	2,6b ± 0,7	18,5b ± 2,2	2,0b ± 0,5
S+OB90	15,3b ± 1,4	2,8b ± 0,8	18,1b ± 2,1	2,0b ± 0,2
S+D90	8,9a ± 1,4	1,5a ± 0,4	10,4a ± 1,8	0,60a ± 0,08
S+D+OF90	7,9a ± 1,0	1,9a ± 0,8	9,8a ± 1,7	1,1a ± 0,3
S+D+OB90	8,1a ± 1,6	2,0a ± 0,4	10,1a ± 1,9	1,3a ± 0,4

5. DISCUSIÓN

5.1. OBTENCIÓN DE LOS NUEVOS BIOESTIMULANTES

Como ya se ha comentado en el apartado de resultados, los nuevos bioestimulantes desarrollados a partir de la okara de soja presentan una gran proporción de proteínas de bajo peso molecular. La disminución de las proteínas de alto peso molecular (>10 kDa) en ambos bioestimulantes y el aumento de las proteínas de bajo peso molecular (<300 Da) nos indican que los procesos de hidrólisis se han llevado a cabo satisfactoriamente y que las proteínas que formaban parte de la okara se han hidrolizado hasta el nivel de péptidos conformados por pocos aminoácidos o, incluso, de aminoácidos libres.

Se planteó en el apartado de objetivos la fabricación de dos bioestimulantes distintos a partir del mismo subproducto. El bioestimulante OB fue el resultado de un único proceso de hidrólisis, llevado a cabo por la endoproteasa subtilisina, mientras que el bioestimulante OF fue el resultado de dos procesos de hidrólisis consecutivos, llevados a cabo por la misma subtilisina y por otra enzima, la exoproteasa Flavourzyme.

La proporción de péptidos menores de 300 Da es mayor en el bioestimulante OF que en el bioestimulante OB, de $68,8 \pm 3,1$ frente a $56,0 \pm 2,5$. Esto sugiere que la acción de la Flavourzyme llevada a cabo en el bioestimulante OF ha permitido un mayor grado de hidrólisis sobre las proteínas que conformaban la materia orgánica de origen. Es decir, la aplicación de dos enzimas, a efectos prácticos complementarias, ha aumentado el grado de rotura de las cadenas peptídicas, originando aminoácidos libres o cadenas conformadas por muy pocos aminoácidos. Además, lo ha hecho en mayor proporción que la hidrólisis con una única enzima llevada a cabo sobre el bioestimulante OB.

El uso de enzimas sobre materia orgánica con el fin de obtener productos con capacidad bioestimulante, entre otras, surge como alternativa al empleo de bases y ácidos fuertes y elevadas temperaturas usados en procesos de hidrólisis química. Esto permite obtener productos con menores inconvenientes desde un punto de vista medioambiental y ecológico, y que además cuenta con beneficios adicionales, como el de estar permitidos en sistemas de agricultura ecológica (Ugolini et al., 2015).

El uso de dos proteasas complementarias está bien establecido como proceso a aplicar sobre diversos tipos de materia orgánica. La predigestión con subtilisina,

en este caso, permite un aumento del número de sitios N-terminales sobre las que la Flavourzyme puede actuar, aumentando el grado de hidrólisis y produciendo un producto distinto. Algunos autores apuntan, además, que el uso de dos enzimas combinadas permite un ahorro económico en la producción de hidrolizados enzimáticos (Villanueva et al., 1999a, 1999b; Vioque, et al., 1999) y otros beneficios adicionales como la reducción de la capacidad alergénica de los productos (Clemente et al., 1999).

En el trabajo de Orts et al. (2017) se usa una única enzima con el fin de obtener un hidrolizado con capacidad biorremediadora en suelos. En este caso, la enzima utilizada fue también la endoproteasa subtilisina procedente de *Bacillus licheniformis*. La distribución de los productos obtenidos en este trabajo es menos uniforme, con un elevado contenido en péptidos entre 10 kDa y 5 kDa (23.5 ± 2.8) y prácticamente el resto del contenido proteico situado en tamaños menores a 300 Da (75.7 ± 10.6). Es decir, con un único proceso de hidrólisis, se consigue una proporción mayor de péptidos menores de 300 Da. Sin embargo, y aunque es tentativa la comparación, es posible que las diferencias en cuanto a la calidad del material de partida (distintos procesos de deshidratación e hidratación del material en origen) hayan sido las responsables de la diferencia en las proporciones entre el producto referido y los obtenidos en este trabajo. Por otro lado, debe recordarse que, en este trabajo, la hidrólisis con subtilisina se permitió durante 20 horas en total (Orts et al., 2017).

Así pues, la comparación más válida es la que puede realizarse entre los productos aquí obtenidos pues proceden estrictamente del mismo material de partida. Como ya se ha mencionado, el uso de una segunda hidrólisis desplaza la proporción de péptidos hacia cadenas de menor tamaño. El efecto que tiene esta diferencia sobre las actividades biológicas del suelo se analizará más adelante.

5.2. EFECTO DE LOS BIOESTIMULANTES SOBRE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL SUELO.

A lo largo de las tres experiencias de incubación se puede comprobar el efecto positivo de los bioestimulantes (OB y OF) sobre las diversas actividades enzimáticas y sobre la comunidad microbiana de los suelos enmendados.

Las enzimas del suelo pueden encontrarse de forma libre, fijadas al suelo (enzimas extracelulares no libres) o pueden ser intracelulares. Los procesos bioquímicos de reciclado de nutrientes y biodegradación de xenobióticos están mediados, en gran parte, por la acción de estas enzimas, que pueden pertenecer a los microorganismos del suelo, a las plantas y su rizosfera o a animales. Su estudio, por tanto, constituye una importante forma de medir la actividad de los microorganismos y su potencial actividad en los procesos mencionados (Burns, 1982).

La actividad deshidrogenasa ha sido ampliamente utilizada como un indicador biológico de la calidad del suelo, al estar bien establecida la relación que existe entre esta y la actividad biológica y a su alto grado de especificidad por su sustrato (García et al., 1997a). La deshidrogenasa es una enzima intracelular y, en consecuencia, está presente en todos los microorganismos viables y no dañados (García et al., 1993).

Esta actividad muestra un aumento significativo tras la aplicación de los bioestimulantes durante los días 5, 10 y 20 desde el inicio de las experiencias de incubación. Esto indica que los bioestimulantes están actuando como una fuente extra de carbono y otros nutrientes y mejorando el estado nutricional del suelo, con las correspondientes consecuencias positivas sobre la comunidad microbiana. Este efecto desaparece en las consecutivas tomas de muestra (días 35, 55 y 90) debido al rápido consumo de los recursos por parte de los microorganismos (principalmente, por parte de las bacterias).

La bioestimulación de la actividad deshidrogenasa fue mayor en el caso de los suelos enmendados con el hidrolizado OF. Teniendo en cuenta que los dos bioestimulantes proceden de la misma materia orgánica, el motivo de su diferente efecto sobre las poblaciones y actividades enzimáticas debe estar en el segundo proceso enzimático al que se ha sometido al bioestimulante OF. Este segundo proceso enzimático, como se ha apuntado anteriormente, ha aumentado la proporción de péptidos de bajo peso molecular (300 Da) y amino ácidos libres en el producto final, frente al hidrolizado OB.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Tejada et al., (2013). En el trabajo de estos autores, se aplican bioestimulantes hidrolizados procedentes de lodos de depuradora y con diverso perfil de tamaños moleculares. Las diferencias

en cuanto al tamaño de las moléculas que conformaba estos bioestimulantes procedían de diferencias en cuanto al tiempo de los procesos de hidrólisis. El resultado, al igual que en el presente trabajo, era el de una mayor activación de la enzima deshidrogenasa en el caso del bioestimulante con mayor proporción de péptidos de bajo peso molecular.

La mayor proporción de estos péptidos indica un aumento del recurso nitrogenado que estas moléculas constituyen, ya que su disponibilidad es mayor para los microorganismos del suelo. Este aumento de la disponibilidad propicia, en consecuencia, un aumento de la proliferación de los microorganismos del suelo (Vasileva-Tonkova et al., 2007).

Esto se relaciona, precisamente, con el hecho de que la actividad ureasa del suelo no muestre estimulación significativa tras la aplicación de cualquiera de los dos bioestimulantes empleados. Ya que la disponibilidad en el medio de moléculas con alto contenido en nitrógeno es elevada y que estas son de bajo tamaño molecular, los microorganismos no necesitan excretar enzimas (ureasa) para obtener este nitrógeno. Esto también concuerda con los resultados obtenidos por García-Martínez et al., (2010a) y Tejada et al., (2013).

Tendencias similares se observan en el caso de las enzimas β -glucosidasa y fosfatasa. En ambos casos, las enzimas muestran un aumento de la activación que se extiende a lo largo de los tres primeros muestreos. En el caso de la fosfatasa, los valores tienden a igualarse con los valores de los suelos control antes que para las actividades deshidrogenasa y β -glucosidasa. Esto provoca que, para el día 35, las actividades no sean significativamente diferentes de los suelos control, aunque sean superiores.

La actividad β -glucosidasa del suelo mostró tendencias similares a las obtenidas en el caso de la actividad deshidrogenasa. La influencia de los dos bioestimulantes es positiva y se traduce en una activación de esta enzima durante, al menos, las primeras tomas de muestra (días 5, 10 y 20). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Parrado et al., (2008), García-Martínez et al., (2010b) y Tejada et al., (2010a, 2013). Estos autores observan una estimulación significativa de la actividad β -glucosidasa tras la aplicación de diversas materias orgánicas (hidrolizado procedente de restos de algarrobo y trigo, y de lodos de depuradora).

Cabe destacar, respecto a la actividad β -glucosidasa, que los valores obtenidos durante las tres experiencias de incubación tienden a mantenerse bajos. Si se atiende a los valores obtenidos por Rodríguez-Morgado et al. (2014) en un suelo de similares características, estos suelen encontrarse entre 1,0 y 1,4 mmol PNP $g^{-1} h^{-1}$ para los controles, mientras que, en el experimento actual, los valores varían entre 0,50 y 0,55 mmol PNP $g^{-1} h^{-1}$. Valores similares pueden consultarse en el trabajo de Franco-Andreu et al. (2016), en el que estos varían entre 1,2 y 1,4 mmol PNP $g^{-1} h^{-1}$ para las muestras empleadas como control.

Dado que el suelo posee condiciones muy similares, la fuente de variación debe ser otra. Algunos autores apuntan a variaciones espaciales de la β -glucosidasa relacionadas con la profundidad. Mungai et al. (2005) informan de una menor actividad β -glucosidasa en profundidad (30 cm) en comparación con la actividad β -glucosidasa superficial (10 cm). Esto pone de manifiesto que pueden existir variaciones espaciales en el mismo lugar de muestreo. Niemi et al. (2005) coinciden con estas visiones y apuntan, además, a que existe variación en la actividad glucosidasa del medio cuando las condiciones climáticas cambian. Entre un suelo sometido a condiciones cálidas y secas y un suelo en condiciones cálidas y húmedas, en muestreos con diferencias de 15 días se encuentran diferencias significativas. Esta tendencia se confirma en suelos con distintas características y a diversas profundidades, lo cual puede hacer pensar que diferencias ambientales pequeñas a nivel experimental han podido originar variaciones entre los resultados obtenidos, pese a la similitud en el suelo empleado.

Respecto a la diversidad microbiana del suelo, se observa un aumento de los PLFAs analizados en el caso de las bacterias (Gram⁺, Gram⁻ y totales) y de los hongos. En el día diez los resultados son aproximadamente 2.5 veces mayores para los suelos tratados con ambos bioestimulantes, sin que se aprecien diferencias significativas entre ellos (pero sí con el control). Este efecto no se encuentra en el día 90 por agotamiento de los recursos aportados en forma de materia orgánica hidrolizada. La degradación de materia orgánica requiere de enzimas producidas por un número limitado de especies (respecto al total), así que la mejora del estado de unos pocos microorganismos puede aumentar la capacidad competitiva general de numerosos grupos (Marschner et al., 2003). Es probable que esta sea la razón por la que la biodiversidad microbiana de los suelos modificados con ambos

bioestimulantes aumente en las fases iniciales de las distintas experiencias de incubación. Tras el consumo de la materia orgánica aportada, las poblaciones microbianas se restablecen.

5.3. EFECTO DE LOS HERBICIDAS SOBRE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL SUELO.

Como se ha visto a lo largo de la introducción, los pesticidas han mejorado la productividad agrícola y han producido una reducción de los costes, así como un aumento de la longevidad de los productos. Los herbicidas, en concreto, permiten el control de las llamadas malas hierbas y un mayor aprovechamiento de los recursos limitados del suelo. A menudo, la aplicación de herbicidas puede no hacerse de forma segura. Ya que parte del producto puede no dirigirse a su objetivo, este puede entrar en contacto con organismos no objetivos, como otras plantas, invertebrados, microorganismos del suelo o incluso sobre los seres humanos, produciendo efectos adversos. La actividad biológica del suelo, desde la de los microorganismos hasta la de las plantas, es uno de los aspectos que pueden verse afectados negativamente por la aplicación de plaguicidas. Estos efectos, normalmente negativos y a menudo irreversibles, pueden traducirse en detrimentos sobre todo el ecosistema.

Las enzimas del suelo juegan un papel predominante en el reciclado de nutrientes y la fertilidad del suelo. Los plaguicidas pueden clasificarse de numerosas formas: de acuerdo con los organismos a los que se dirigen, a la familia química a la que pertenecen o al tipo de riesgo para la salud que pueden presentar. Así mismo, también pueden clasificarse como de uso restringido o de uso general; los primeros solo pueden comprarse y aplicarse por personal especializado y certificado, mientras que los segundos pueden ser comprados y aplicados por cualquier persona. La capacidad del suelo para filtrar, amortiguar, degradar, inmovilizar o detoxificar plaguicidas es una función del suelo indicadora de la calidad del mismo.

La degradación de compuestos químicos orgánicos puede ocurrir directa o indirectamente y puede llevar a la degradación completa o parcial de la especie química (Gianfreda y Rao, 2008). La mineralización completa de un herbicida puede ocurrir cuando estos producen la presión selectiva necesaria sobre los microorganismos capaces de degradarlos o de producir enzimas extracelulares capaces de hacerlo. Las enzimas involucradas en la transformación de estos

compuestos suelen ser oxidorreductasas, responsables de reacciones oxidativas y reductoras, hidrolasas, responsables de la rotura de diversos tipos de enlaces químicos, y las sintasas, que catalizan reacciones de unión.

Para que ocurran las reacciones de degradación en un suelo deben darse diversas condiciones, según recogen Shukla y Varma (2011): los microorganismos del suelo deben ser capaces de sobrevivir en un suelo contaminado por el plaguicida, además de metabolizarlo y degradarlo (a través de su maquinaria enzimática). Además, el plaguicida debe de contar con ciertas propiedades que lo haga n apto para la degradación: relativamente elevada solubilidad, baja persistencia, elevada biodisponibilidad, proximidad espacial a las enzimas u organismos degradativos; asimismo, las condiciones del suelo deben ser las propicias para la estabilidad de las enzimas degradativas y proliferación de los microorganismos de las que proceden.

Los cambios en la capacidad degradadora del suelo pueden originar una disminución en su calidad. Por tanto, el seguimiento y determinación de propiedades, como la actividad de diversas enzimas, especialmente en sistemas agrícolas, es una opción para evaluar el estado de un suelo y compararlo. Las actividades enzimáticas están relacionadas directamente con el contenido en nutrientes y, además, responden rápidamente a cambios derivados de la actividad humana, como variaciones en el sistema de manejo, adición de xenobióticos como herbicidas, etc. Son, por tanto, muy buenos indicadores de calidad (García et al., 1997b).

El efecto de los plaguicidas sobre las enzimas puede ser directo y reversible cuando es el resultado de interacciones reversibles entre la molécula de plaguicida y la enzima. Puede darse, asimismo, alteración de las proteínas que conforman la enzima e inhibición competitiva o no competitiva del sustrato. El mismo efecto puede producirse por los metabolitos procedentes de una degradación, completa o parcial, del plaguicida. La inhibición completa de las enzimas puede ocurrir cuando un grupo catalítico se une de forma covalente a la molécula, alterando su estructura y, por tanto, su función.

Sin embargo, el efecto en el que se centra este trabajo, es el efecto indirecto que pueden tener los plaguicidas sobre las actividades enzimáticas mediante de su efecto tóxico sobre las comunidades microbianas del suelo, en concreto, sobre bacterias y hongos. Los plaguicidas pueden alterar el tamaño, la estructura y las

funciones de estas comunidades, produciendo efectos a mayor escala sobre los ecosistemas que se asientan sobre el suelo. Estos efectos tóxicos pueden ser consecuencia de la alteración de la producción de enzimas o de cambios en las funciones de las membranas, llegando a producir la muerte de los microorganismos más susceptibles. La degradación de estas células puede liberar al medio nutrientes hasta el momento retenidos. Esto, unido a la capacidad de algunos microorganismos competentes de usar los plaguicidas como fuentes de carbono pueden llevar a cambios inesperados en la composición microbiológica del suelo (Gianfreda y Rao, 2008). Cabe destacar, por último y de acuerdo con las conclusiones de Shaffer (1993), que la respuesta de una enzima a un plaguicida es, en última instancia, impredecible: una plaguicida que actúe como inhibidor en unas condiciones dadas para una enzima, puede hacerlo como activador en otros suelos con condiciones diferentes.

5.4. OXIFLUORFÉN

5.4.1. EFECTO DEL OXIFLUORFÉN SOBRE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL SUELO

El oxifluorfén es persistente y relativamente inmóvil una vez incorporado al suelo. Además, es resistente a la hidrólisis cuando llega a aguas subsuperficiales (o turbias), donde está a salvo de la fotólisis, fenómeno al que es especialmente sensible. El lixiviado hasta aguas subterráneas es poco probable debido, precisamente, a su escasa movilidad. Su presencia en aguas superficiales, corrientes o no, es más preocupante, pero la fotólisis sigue siendo un fenómeno capaz de degradarlo. No se encuentran especies químicas derivadas, de manera que el oxifluorfén es el compuesto de mayor importancia ecotoxicológica (Fadayomi y Warren, 1977; EPA, 2002; Calderón et al., 2010).

Dado lo expuesto, el oxifluorfén presenta su mayor riesgo para plantas terrestres, cultivadas o no, y para organismos acuáticos, mediante deriva y escorrentía de formulaciones líquidas, así como de movimiento del suelo contaminado con oxifluorfén. Queda claro, por tanto, que reducir la carga del herbicida en suelo contaminado es de gran importancia, ya que es el principal reservorio.

En el presente trabajo, se ha comprobado que el oxifluorfén presenta un efecto inhibitorio sobre las actividades enzimáticas del suelo y, por tanto, un efecto tóxico sobre, al menos, parte de los microorganismos del suelo y su biodiversidad.

Esto está en concordancia con otros estudios, como los de (Baruah y Mishra, 1986; García-Orenes et al., 2010; Sheeba et al., 2011; Gómez et al., 2014). García-Orenes et al. (2010) muestran inhibición de la respiración basal del suelo, así como de las diversas actividades enzimáticas analizadas (deshidrogenasa, proteasa, fosfatasa, ureasa y β -glucosidasa) en un suelo xerorthent típico, bajo un clima mediterráneo semiárido.

Gómez et al. (2014) encuentran inhibición de las actividades enzimáticas deshidrogenasa, fosfatasa, ureasa y β -glucosidasa; así como una disminución de la población bacteriana significativa y una disminución ligera de la población fúngica del suelo (un regosol calcárico en estudios de microcosmos). Baruah y Mishra (1986) informan también de un decrecimiento a largo plazo de la actividad deshidrogenasa (que viene acompañado de un aumento en los primeros días del experimento).

Sin embargo, contrasta con trabajos como los de (Shukla, 1997), en el que muestra un efecto positivo tanto sobre la población microbiana (bacteriana y fúngica) como sobre las actividades enzimáticas estudiadas (deshidrogenasa y fosfatasa alcalina) en un suelo procedente de plantaciones de arroz. Lo mismo ocurre en el caso de la aplicación de este herbicida en plantaciones similares en el trabajo de Das et al. (2003), en el que se observa una estimulación de la comunidad de microorganismos solubilizadores de fosfato.

Otros autores encuentran resultados diversos e incluso aparentemente contradictorios de acuerdo a los parámetros estudiados. Saha et al. (2015) comparten resultados en los que el oxifluorfén muestra efectos positivos sobre la biomasa microbiana del suelo, la actividad fluoresceín-diacetato hidrolasa, la fosfatasa alcalina y las tasas de amonificación, mientras que tiene efectos negativos sobre la actividad deshidrogenasa, fosfatasa ácida, tasa de nitrificación y disponibilidad de fósforo en plantaciones de cacahuete, *Arachis hypogea*, sobre terra preta.

En los resultados aquí presentados, observamos un efecto tóxico del oxifluorfén sobre todas las actividades enzimáticas analizadas. El efecto es

pronunciado desde el inicio del experimento (día 5 de muestreo) y duradero hasta el último día de muestreo (día 90). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores como García-Orenes et al. (2010), Gómez et al. (2014) y Franco-Andreu et al. (2016).

La actividad deshidrogenasa es un buen medidor de la calidad del suelo por su rápida respuesta a cambios ambientales. Está relacionada con la degradación inicial de la materia orgánica (Bolton et al., 1985). Más que con las enzimas libres presentes en la matriz el suelo, la actividad deshidrogenasa parece estar más relacionada con el estado metabólico general del suelo, así como con la actividad de la población general (Ross, 1970). La deshidrogenasa del suelo es una enzima intracelular asociada con los procesos de respiración microbianos del suelo. Además de este hecho, tiene otras ventajas como indicador de cambios en la calidad del suelo, como su correlación con otros índices de actividad microbiana del suelo, como la respiración basal y la biomasa de carbono (García et al., 1997a). La reducción de esta actividad puede indicar una incapacidad por parte de la microbiota nativa del suelo, o por la mayoría de esta, de usar el herbicida como fuente de carbono, además del efecto tóxico que pueda producir (García-Orenes et al., 2010).

Saha et al. (2015), además, apuntan a que el grupo NO_2^- del oxifluorfén puede actuar como aceptor de electrones alternativo, afectando todavía más a la disminución de la actividad deshidrogenasa. Este efecto puede estar presente en el trabajo aquí presentado, pero en otras publicaciones en las que la única enzima inhibida es la deshidrogenasa, puede ser el principal responsable de esta inhibición (Shukla, 1997).

Las actividades ureasa, fosfatasa y β -glucosidasa son buenos indicadores de los cambios en la fertilidad del suelo; las tres son hidrolasas encargadas del reciclado de los nutrientes N, P y C y su retorno a la biota del suelo. La inhibición de estas enzimas por parte del oxifluorfén indica una reducción, por tanto, de la fertilidad y de la capacidad de reciclado de nutrientes del suelo.

Respecto a la actividad ureasa, se observa una inhibición persistente de esta enzima desde el inicio hasta el final de la experiencia de incubación. La activación de la actividad ureasa está relacionada con adiciones de materia orgánica compleja (Goyal et al., 1999); la ausencia de activación e inhibición puede relacionarse con una estabilidad de las condiciones experimentales o con la adición de materias

orgánicas ricas en compuestos nitrogenados no complejos (García-Orenes et al., 2010; Tejada et al., 2013; Gómez et al., 2014). En este caso, al no haber un aporte de materia orgánica de ningún tipo, si no de un herbicida de comprobado efecto tóxico sobre la población microbiana, la disminución e inactivación de la población tiene como consecuencia una disminución de la actividad ureasa.

En lo que respecta a las actividades fosfatasa y β -glucosidasa, se observan efectos y tendencias similares a las recogidas en el caso de las actividades deshidrogenasa y ureasa. El oxifluorfén causa un efecto tóxico desde su aplicación y mantenido en el tiempo hasta el final de la experiencia de incubación. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Gómez et al. (2014) y Rodríguez-Morgado et al. (2014), en los que se observa una inhibición de las actividades enzimáticas mencionadas desde el inicio de los diversos experimentos hasta el final de los mismos (120 días en estos casos).

Sobre las poblaciones de bacterias y hongos, gracias al análisis de los PLFAs, se puede observar una disminución de las bacterias Gram⁺, Gram⁻, totales y hongos en las muestras tomadas el día 10 y contaminadas con oxifluorfén. Esto, unido a la inhibición de ciertas actividades enzimáticas, ayuda a confirmar el efecto tóxico del herbicida sobre las poblaciones microbianas.

Respecto a al segundo análisis de PLFAs, el del día 90, se observa que los valores del suelo contaminado se mantienen similares a los del inicio del tratamiento (S+Ox10) y que no se aproximan a los valores del suelo no contaminado, ni al principio ni al final de la experiencia. Esto indica que el herbicida resulta tóxico incluso a las bajas concentraciones que se registran al final de la experiencia, en otras palabras, se puede confirmar la persistencia del oxifluorfén y la elevada toxicidad sobre las comunidades microbianas del suelo incluso a bajas concentraciones.

Tanto los valores como las tendencias encontrados concuerdan con los obtenidos por Rodríguez-Morgado et al., (2014), respecto al suelo control y al contaminado. Sí es cierto, sin embargo, que se encuentra mayor abundancia relativa de bacterias Gram⁻ en los suelos del presente trabajo que en la referencia citada.

La disminución de las poblaciones bacterianas puede estar relacionada con la disminución de la actividad bacteriana de dos formas. Según Renella et al., (2005), el cambio de las propiedades biológicas del suelo puede deberse tanto a una

inactivación de las enzimas extracelulares por parte de los xenobióticos, como a una menor secreción de estas desde los microorganismos.

5.4.2. CAPACIDAD BIORREMIADORA DE LOS BIOESTIMULANTES

Como ya se ha visto, el efecto de la aplicación de ambos BS fue positivo sobre la actividad deshidrogenasa. La aplicación de oxifluorfén sobre suelo enmendado orgánicamente fue, al igual que en el suelo control, de disminución de la actividad enzimática, sin embargo, la inhibición fue menor en suelos enmendados. Desde el día 35 de muestreo y hasta el final del periodo experimental, los tratamientos S+Ox+OF y S+Ox+OB tienden a igualarse con el tratamiento S+Ox y los valores nunca llegan a los niveles del suelo control, S (tabla 32).

En este sentido, estamos ante dos fenómenos: por un lado, la persistencia del herbicida impide que la actividad del suelo llegue a los niveles del suelo no contaminado. Algunos autores informan también de una elevada persistencia del herbicida oxifluorfén: Ying & Williams (2000) cifran la persistencia del oxifluorfén en 119 días y además hacen hincapié en la alta capacidad de este para adsorberse a las partículas del suelo, así como en la gran cantidad de factores que intervienen en la degradación del oxifluorfén. Por otro lado, el efecto de los BS es máximo en los primeros muestreos (5 días) y va disminuyendo hasta un momento entre los 20 y los 35 días, en los que puede considerarse que su efecto se ha disipado por consumo de los recursos por parte de la microbiota del suelo. Se observa una tendencia similar en el trabajo de Gómez et al. (2014), en el que el efecto de las enmiendas orgánicas es máximo entre el día 10 y el 20, y comienza a disiparse después de este punto.

El efecto inhibitorio del oxifluorfén fue menor en los suelos enmendados con el bioestimulante OF que en los enmendados con el BS OB, en los dos primeros muestreos (días 5 y 10). Esto no se observa en el caso de la fosfatasa y de la β -glucosidasa. En estas actividades, se observa una mayor actividad inicial para los suelos contaminados tratados con el BS OB. Esta diferencia puede deberse al mayor gasto energético que deben realizar los microorganismos para extraer los recursos del BS OB, de más difícil acceso que en el caso del BS OF (Meidute et al., 2008).

Tejada et al., (2013) desarrollan diversos bioestimulantes que se distinguen, entre otros, por el tamaño molecular de las proteínas y péptidos que los constituyen.

En el presente trabajo los bioestimulantes desarrollados difieren, como ya se ha mencionado, en el mayor contenido en péptidos de bajo peso molecular (< 300 Da) de OF frente a OB, si bien ambos cuentan con un contenido relativamente elevado de estos. El alto contenido en proteínas de bajo peso molecular permite una disponibilidad mayor y más rápida del N por parte de los microorganismos del suelo (y, por extensión, de otros organismos como las plantas). Esto puede explicar la elevada actividad deshidrogenasa de los primeros días de muestreo, especialmente si se compara esta con los valores obtenidos en Orts et al. (2017), donde la actividad deshidrogenasa del suelo tratado con okara puro (mayor proporción de péptidos de elevado peso molecular) es solo ligeramente superior a la del suelo control del presente trabajo. Estas diferencias cualitativas en los bioestimulantes son las responsables de la mayor inhibición de la toxicidad del herbicida en los suelos enmendados con OF, respecto a los tratados con OB.

El uso de los bioestimulantes, además, permite un aumento de la población microbiana en general, pero cuando se añade el herbicida a los suelos enmendados solo los microorganismos resistentes se ven favorecidos, permitiendo una selección positiva de estos y colaborando en la degradación del compuesto xenobiótico (Eichner et al., 1999; Van Der Meer, 2006).

La fosfatasa es una enzima extracelular producida por muchos microorganismos del suelo que es responsable de la mineralización del fósforo en dicho ambiente, es decir, de la hidrólisis de los compuestos del fósforo a fósforo inorgánico (Hussain et al., 2009). Los valores de la actividad fosfatasa son similares a los valores recogidos por Rodríguez-Morgado et al. (2014), en sus ensayos con suelo contaminado con oxifluorfén y enmendado con bioestimulantes procedentes de plumas de pollo y lodos de depuradora; o los de Gómez et al. (2014), con ensayos en suelo contaminado con oxifluorfén y enmendado con materia orgánica procedente de diferentes fuentes (salvado de arroz, residuos sólidos urbanos y estiércol de oveja).

Los productos de hidrólisis de la β -glucosidasa son una importante fuente de carbono para los microorganismos del suelo; cataliza la hidrólisis de disacáridos a β -glucósidos (Eivazi & Tabatabai, 1988; Hussain et al., 2009). La inhibición de la actividad β -glucosidasa también fue menor cuando se aplicaron enmiendas orgánicas al suelo contaminado, en concordancia con trabajos realizados con

bioestimulantes procedentes de materias orgánicas similares (Orts et al., 2017) y a los ensayos de Rodríguez-Morgado et al. (2014) y Gómez et al. (2014) citados con anterioridad.

Respecto a la ureasa, no se encuentra una disminución de la inhibición causada por el oxifluorfén al aplicar los bioestimulantes. La actividad no fue estimulada tras la adición de los bioestimulantes en ningún caso. No hubo diferencias entre el final y el inicio del experimento. El elevado grado de hidrólisis, responsable del alto contenido en péptidos de bajo peso molecular, puede ser también responsable de la ausencia de estimulación de actividad ureasa. No hay necesidad por parte de los microorganismos del suelo de excretar enzimas para digerir compuestos nitrogenados, ya que los bioestimulantes ya aportan estos compuestos fácilmente asimilables en forma de aminoácidos libres o de cadenas peptídicas de corta extensión (García-Orenes et al., 2010; Gómez et al., 2014; Tejada et al., 2013).

Los suelos enmendados con materias orgánicas más ricas en péptidos de elevado peso molecular sí que muestran aumentos de la actividad ureasa pasado un tiempo tras la aplicación, como puede ser el caso de los estudios de Tejada et al., (2011) o de Gómez et al., (2014). En general, la actividad ureasa está relacionada con la acumulación de materia orgánica en el suelo (Goyal et al., 1999).

La aplicación de las materias orgánicas hidrolizadas en este trabajo produjo un efecto positivo y estadísticamente significativo sobre los grupos estudiados (bacterias Gram+, Gram, totales y hongos) respecto a los suelos contaminados y no enmendados. Este efecto fue más acusado en el caso de las bacterias Gram+ y menor en el caso de los hongos. Los valores de los suelos enmendados y contaminados quedan incluso por encima de los valores de suelo control (no de forma significativa), cuando se habla de la primera toma de muestra (día 10). Este efecto desaparece en el día 90, en el que los PLFAs analizados toman valores similares a los del suelo contaminado y no enmendado del día 10. Esto es un signo de que el efecto positivo de la materia orgánica hidrolizada es pasajero y solo se da a corto plazo.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Rodríguez-Morgado et al., (2014) en suelo contaminado con el mismo herbicida y enmendado con hidrolizados procedentes de plumas de pollo o lodos de depuradora. De forma similar, al principio del experimento la estimulación fue notable, mientras que, al

final, los valores coincidían con los de un suelo contaminado con oxifluorfén. Esto indica una elevada persistencia y efecto tóxico del oxifluorfén. Los resultados también concuerdan con los obtenidos por Gómez et al. (2014), en cuyo trabajo la estimulación de las poblaciones estudiadas fue mayor cuando se usaron enmiendas orgánicas con elevada proporción de péptidos de bajo peso molecular.

5.4.3. Evolución del oxifluorfén en el suelo

La cantidad de oxifluorfén al final del experimento en los suelos no enmendados cae hasta casi la prácticamente la mitad de la cantidad medida en el día 5. Esto indica una vida media de aproximadamente 90 días, en concordancia solo con algunos de los trabajos consultados, como se verá a continuación. La cantidad de herbicida presente al final del experimento es menor para los suelos enmendados con los hidrolizados y, además, la cantidad final es menor en los suelos tratados con OF que con OB. Esto hace pensar que el efecto positivo de los bioestimulantes se traduce en una mayor degradación por parte de los microorganismos y que este es más acusado en el bioestimulante con mayor proporción de péptidos de bajo peso molecular.

Algunos autores muestran una alta persistencia del oxifluorfén en suelos. Baruah y Mishra (1986) informan de una vida media de 72 a 160 días. Ying y Williams (2000) establecen la vida media del herbicida en 119 días en viñedos plantados sobre un suelo tipo haploxeralf. Distintos autores encuentran vidas medias muy inferiores en suelos muy distintos. Das et al. (2003) informan de una vida media de 12 días en suelos plantados con arroz, en concordancia con otros autores, como Walker et al. (1988), que citan la vida media en 16 días sobre sedimento procedente de estuario.

Dada la importancia de la actividad microbiana en la degradación de herbicidas, Das et al. (2003) informan de la importante actividad de los microorganismos de la rizosfera como principales responsables de la actividad degradativa de este y otros herbicidas, como el oxadiazón. Las enormes diferencias experimentales (suelo arcilloso aluvial, Fluvaquent típico) hacen difícil comparar estos estudios, pero resulta interesante comprobar que, pese a la corta vida media en comparación, se observa persistencia del herbicida a los 60 días del inicio del trabajo citado.

Ying y Williams (2000) destacan la diferencia entre la elevada vida del oxifluorfén que detectan (119 días) frente a la de otros manuales de referencia (Humburg et al, 1989), que la establecen en 30 – 40 días. Explican esta diferencia basándose en que, en suelo, el herbicida es poco sensible a la degradación por microorganismos, así como a hidrólisis en rangos de pH de 5 – 9. Esta resistencia a la degradación, unida a su fuerte adsorción a partículas del suelo, lo hacen especialmente persistente.

Por otro lado, se observa un aumento de la velocidad de degradación del oxifluorfén en los suelos enmendados respecto a la degradación en los suelos control. Este incremento puede relacionarse con el aumento observado en las poblaciones bacterianas. Dicho aumento es especialmente relevante al inicio de los tratamientos, coincidiendo con los periodos de estimulación de las actividades enzimáticas analizadas (excepto la ureasa). Los resultados obtenidos concuerdan con los de Rodríguez-Morgado et al. (2014). En sus ensayos se encuentra un aumento de la velocidad de degradación del mismo herbicida cuando las muestras de suelo son tratadas con bioestimulantes hidrolizados procedentes de diversas fuentes de materia orgánica. Además, el efecto biorremediador del primero fue mayor, coincidiendo con una elevada proporción de péptidos bajo tamaño molecular frente al segundo ($64,0 \pm 3,6$ % de péptidos < 300 Da, frente a $34,0 \pm 3,1$ % de péptidos < 300 Da).

5.5. IMAZAMOX

5.5.1. EFECTO DEL IMAZAMOX SOBRE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL SUELO

La principal vía de degradación para el imazamox es la fotólisis y la degradación mediante microorganismos en suelos aeróbicos. La degradación en ambiente acuático o en condiciones anaeróbicas es escasa. No se informa de problemas de bioacumulación. Estudios de laboratorio confirman su alto potencial como lixiviado, aunque ensayos de campo parecen indicar que no hay problemas más allá de los primeros 45 cm de suelo (Cessna et al., 2012; Cabrera et al., 2016).

Respecto al efecto del imazamox sobre las actividades enzimáticas, se observa un efecto muy similar al comentado en el caso del oxifluorfén. La inhibición de la actividad deshidrogenasa, fosfatasa, β -glucosidasa y ureasa corrobora el efecto tóxico del herbicida sobre los microorganismos del suelo. Sobre la actividad

deshidrogenasa, el efecto del imazamox se mantiene desde la primera toma de muestra hasta el final del experimento. Lo mismo ocurre en el caso de las actividades β -glucosidasa y fosfatasa.

Los trabajos sobre el efecto de imazamox en las actividades enzimáticas son escasos, pero sí se encuentran datos del efecto de otras imidazolinonas, como el imazetapir. Otros trabajos confirman el efecto tóxico del herbicida a través de la medición de otros parámetros, como el contenido en carbono microbiano (Vischetti et al., 2002).

Perucci et al. (2000) no observan efecto sobre la actividad fosfatasa del imazetapir cuando éste es aplicado a tasa de campo (50 g ha^{-1}), pero sí que observan un efecto cuando el herbicida se aplica a diez veces esta tasa. El efecto fue el de la estimulación de la actividad, pero los autores advierten que tomar este hecho como un efecto positivo puede no resultar correcto, ya que la fosfatasa alcalina no solo está involucrada en la toma de fosfato del medio, sino que también tiene un papel en la división celular y la transducción de señales (Riccio et al., 1997); además, su síntesis también puede ser posible en condiciones en las que el crecimiento no lo sea (Özkanca y Flint, 1997). La conclusión de este estudio es que el imazetapir resulta tóxico sobre la comunidad microbiana (Perucci et al., 2000).

En un experimento anterior de los mismos autores (Perucci y Scarponi, 1994), el mismo herbicida (imazetapir) inhibió la actividad deshidrogenasa del suelo cuando se aplicó a 10 y 100 veces el nivel normal de aplicación. Esto refuerza la idea de que las imidazolinonas pueden afectar, en general, a la población microbiana del suelo, especialmente cuando se acumulan o cuando se aplican por encima del nivel recomendado. La deshidrogenasa del suelo es un buen indicador de la actividad del sistema redox microbiano y puede ser considerada un indicador de la actividad oxidativa del suelo (Rossel et al., 1992). Una inhibición de esta indica una menor actividad microbiana, lo que apunta al efecto tóxico de las imidazolinonas.

Hay que destacar, como se ha visto en el apartado de resultados, que la actividad ureasa aumenta según lo hace el tiempo en los tratamientos contaminados con el herbicida imazamox (figura 18). Es posible que el efecto tóxico del imazamox haya provocado un cambio en la comunidad de bacterias y hongos, de manera que han proliferado microorganismos capaces de usarlo como fuente de carbono; es

decir, se estaría hablando de un proceso de selección positiva. Dado un cambio en el ambiente, es fácil pensar que este puede afectar positivamente a ciertos grupos de microorganismos concretos de entre la enorme biodiversidad que puede albergar el suelo (Van Der Meer, 2006). Sin embargo, de ser así, debería observarse un repunte análogo en el resto de actividades enzimáticas, cosa que puede observarse solo ligeramente, así que esta afirmación debe tomarse con precaución.

Sannino y Gianfreda (2001) encuentra una situación similar, en la que la actividad ureasa se ve incrementada cuando el suelo está contaminado con el herbicida glifosato. En esta situación, además, se encontró también que la actividad invertasa se vio incrementada a la vez que la actividad fosfatasa se vio inhibida. Otras moléculas que han demostrado aumentar la actividad ureasa son los fungicidas carbendazima y validamicina. En el caso de la validamicina, esto ocurre poco después de la aplicación y la actividad puede mantenerse elevada durante cierto tiempo (hasta 35 días, dependiendo de la dosis) (Qian et al., 2007). En este caso, la activación ocurre mientras está presente el fungicida, de manera que los autores apuntan a que esta o alguno de sus productos de degradación están actuando como fuentes de carbono, siguiendo un comportamiento muy distinto al planteado aquí.

La carbendazima ha demostrado afectar positivamente a la actividad ureasa, en solitario o en combinación con otros compuestos (Yan et al., 2011). De nuevo, se observa que el efecto de este fungicida tiene lugar tras su aplicación y que disminuye con el tiempo, según se consume el aporte de carbendazima, que funciona como fuente de carbono.

Dadas las diferencias entre las distintas evoluciones, resulta difícil pensar que el motivo de la activación tardía de la actividad ureasa en el caso del imazamox es que este o sus productos derivados estén funcionando como fuente de carbono. La causa más probable del repunte de las actividades enzimáticas, especialmente de la ureasa, es, por tanto, que los niveles de imazamox hayan alcanzado un punto tan bajo que no resulten tóxicos (o lo hagan en menor medida).

En cuanto al análisis de PLFAs, se observa una acusada disminución (>50%) en la primera toma de muestra de los correspondientes a los grupos estudiados. Esto apoya la idea del efecto tóxico de esta imidazolinona sobre los microorganismos del suelo. Algunos autores relacionan la toxicidad de las imidazolinonas con la presencia

de grupos que se encuentran en la molécula de imazamox, como OH y OCH₃ (Desai et al., 2009). En la toma de muestras del día 90 (S+I90) no se observa recuperación de las poblaciones, salvo en el caso de las poblaciones de bacterias Gram⁺, que no resultan significativamente diferentes de los controles (S10 y S90), pero tampoco de los suelos tratados con imazamox (S+I10), obteniéndose un resultado intermedio. El hecho de que el resto de poblaciones de microorganismos estudiadas no se recuperen también indica que el herbicida o sus moléculas derivadas pueden seguir resultando ligeramente tóxicos a los niveles presentes.

Es interesante encontrar un efecto negativo del imazamox sobre las comunidades fúngicas del suelo puesto que estudios previos informaban de un aumento en el número de hongos en suelos forestales tratados con el mismo herbicida (Vasic et al., 2019).

5.5.2. CAPACIDAD BIORREMIADORA DE LOS BIOESTIMULANTES

Como se ha comentado, el efecto de la aplicación de los dos bioestimulantes en la actividad deshidrogenasa fue positivo. La aplicación del imazamox sobre suelo enmendado con los BS (S+I+OF y S+I+OB) fue, al igual que con el control, negativo, dándose una inhibición de la actividad deshidrogenasa. Sin embargo, la inhibición de esta actividad fue menor en suelos enmendados que en los no enmendados. Al igual que en la primera experiencia de incubación, el efecto de los bioestimulantes es máximo en la primera toma de muestra (día 5) y disminuye progresivamente hasta que tiende a igualarse al tratamiento S+I.

La falta de diferencia significativa entre los valores finales de los tres tratamientos mencionados puede atribuirse al efecto residual del herbicida imazamox, aunque, como ya se ha visto, existe un repunte en la actividad deshidrogenasa hacia el final del experimento que apunta a que los niveles del herbicida son los suficientemente bajos como para que su toxicidad sea menor. La disminución progresiva inicial de la actividad deshidrogenasa puede atribuirse, por otro lado, al agotamiento por parte de los microorganismos del aporte de nutrientes extra que significaban los bioestimulantes.

El efecto inhibitorio del imazamox fue menor en los suelos enmendados con el bioestimulante OF que en los suelos a los que se aplicó el bioestimulante OB. Esto puede apreciarse en la actividad deshidrogenasa de S+I+OF de los días 5 y 10

(aunque en menor medida en esta última), en la actividad fosfatasa del día 5 (y en menor medida en el día 10), pero no en la actividad β -glucosidasa de forma significativa (a pesar de que siempre se mantenga por encima la actividad de S+I+OF sobre la de S+I+OB).

Este último hecho puede deberse a que la actividad β -glucosidasa se ha mantenido relativamente baja durante toda la experiencia de incubación, como se ha explicado anteriormente.

Respecto al motivo por el que el bioestimulante OF puede haber tenido mayor efecto en la inhibición del imazamox, como se ha apuntado con anterioridad, todo apunta a que el mayor grado de hidrólisis y mayor contenido en cadenas peptídicas cortas y aminoácidos libres (<300 Da) sean los responsables de este fenómeno.

En cuanto a la evolución de las actividades deshidrogenasa, fosfatasa y β -glucosidasa en suelo a lo largo del experimento, las tendencias recogidas coinciden con las esperadas según otros trabajos en los que se han utilizado materias orgánicas hidrolizadas como bioestimulantes.

Rodríguez-Morgado et al. (2015b) utilizan bioestimulantes hidrolizados procedentes de lodo de depuradoras y plumas en suelos contaminados con PAHs y, de forma similar, observan una menor inhibición de la actividad enzimática máxima al comienzo de las experiencias de incubación (día 7) que disminuye progresivamente hasta alcanzar los valores del suelo control correspondiente. Dos bioestimulantes derivados de salvado de arroz hidrolizado fueron utilizados en un trabajo sobre la toxicidad del herbicida oxifluorfén (Gómez et al., 2014) sobre un regosol calcárico (FAO, 1989). Ambos contaban con un alto contenido en materia orgánica (> 50%) y un alto contenido (> 60%) en moléculas de bajo peso molecular (<300 Da). La diferencia entre ambos radicaba en el contenido en lípidos (2.8 ± 0.4 g kg⁻¹ en el llamado RB1, frente a 11.2 ± 1.4 g kg⁻¹ en el denominado RB2). Se observó una menor inhibición de las actividades deshidrogenasa, fosfatasa y β -glucosidasa en suelos contaminados enmendados con los bioestimulantes a base de salvado de arroz. La disminución de la población de bacterias y hongos fue también atenuada por la aplicación de ambos bioestimulantes. En este estudio se aprecia también una disminución progresiva de la cantidad e influencia del herbicida utilizado.

La capacidad bioestimulante de materia orgánica hidrolizada está ampliamente comprobada con hidrolizados procedentes de materias primas tan diversas como el germen de algarrobo (Parrado et al., 2008; García-Martínez et al., 2010b), lodos de depuradora (Rodríguez-Morgado et al., 2014; Tejada et al., 2014), salvado de arroz (Tejada et al., 2011a) o, como ya se ha mencionado, plumas de aves de corral (Rodríguez-Morgado et al., 2015b).

Como ya se ha dicho, las diferencias entre los efectos de los bioestimulantes OF y OB en las actividades fosfatasa y β -glucosidasa son menores. La mayor actividad de los tratamientos con OB puede explicarse por el mayor gasto energético por parte de los microorganismos para extraer nutrientes que son de más fácil acceso en el BS OF, al tener este último mayor cantidad de péptidos con bajo peso molecular (Meidute et al., 2008). La fosfatasa es una enzima extracelular producida por los microorganismos del suelo y responsable de la mineralización del fósforo, entre otras funciones (Hussain et al., 2009). Los valores de esta actividad son similares a los valores de los que informan Rodríguez-Morgado et al. (2014), en sus experimentos con suelo contaminado con oxifluorfén y enmendado con bioestimulantes procedentes de hidrolizados de lodos de depuradora y plumas de aves; o los de Gómez et al. (2014), con ensayos con materia orgánica hidrolizada procedente de diferentes fuentes (salvado de arroz, residuos sólidos urbanos y estiércol de oveja) sobre suelo contaminado con oxifluorfén.

En lo que respecta a la actividad ureasa, no se aprecia una disminución de la inhibición causada por el herbicida tras la aplicación de los bioestimulantes. El elevado grado de hidrólisis, causante del alto contenido en péptidos de bajo peso molecular, puede ser también la causa de la ausencia de estimulación de esta actividad. Los microorganismos no tienen necesidad de excretar enzimas para hidrolizar compuestos nitrogenados ya que los bioestimulantes ya aportan estos compuestos de una forma fácilmente asimilable, como aminoácidos libres o como cadenas peptídicas cortas (García-Orenes et al., 2010; Tejada et al., 2013; Gómez et al., 2014).

Orts et al. (2017) encuentran este efecto sobre la actividad ureasa también en suelos contaminados con el herbicida clorpirifós y tratados con un hidrolizado procedente de okara. No solo eso, sino que también observan un aumento progresivo de esta actividad cuando el bioestimulante utilizado es okara puro (no

hidrolizado), con un contenido menor en péptidos de bajo peso molecular ($33,2 \pm 6,4$ frente a $75,7 \pm 10,6$ % del producto hidrolizado), confirmando la relación de la actividad ureasa con la distribución del tamaño de las moléculas.

La aplicación de materias orgánicas hidrolizadas sobre la comunidad microbiana mostró un efecto positivo, tal y como se ha comentado en el apartado de resultados. El aporte extra de materia orgánica, que funciona como fuente de carbono, entre otros nutrientes, permite que los efectos negativos del imazamox sean de menor grado. Así, se observa, en el primer muestreo (día 10) un incremento de las poblaciones bacterias $>50\%$ respecto a los suelos contaminados con imazamox de la misma fecha, sin que se observen diferencias significativas entre los efectos de ambos bioestimulantes. Sin embargo, este efecto no es muy acusado sobre las poblaciones fúngicas (no es significativamente diferente, aunque el nivel de PLFAs fúngicos sea superior en los casos S+I+OF10 y S+I+OB10).

Para la siguiente toma de muestra (día 90), las poblaciones de bacterias Gram⁺ se muestran superiores a los del primer muestreo (S+I10), pero inferiores a las de los suelos control (S90) y a las de los suelos enmendados, pero no contaminados (S+OF90, S+OB90). Lo mismo ocurre con las bacterias totales. Esto apunta a que los niveles de imazamox siguen siendo ligeramente tóxicos y a que el efecto de los bioestimulantes en el día 90 es escaso, por su consumición por parte de los microorganismos (esto se deduce al comparar con los suelos contaminados y enmendados de la primera toma de muestra). Para las bacterias Gram⁻, los valores de PLFAs en el día 90 son superiores en el caso de los suelos enmendados, en comparación a S+I10, y no significativamente diferentes de los suelos control (S10 y S90) y de los suelos enmendados y contaminados (S+I+OF10, S+I+OB10, S+I+OF90 y S+I+OB90). Ya que esto solo ocurre sobre este grupo de bacterias, es posible que estemos ante un caso de selección positiva ejercida por la presencia del herbicida o a un menor efecto negativo del imazamox. Por otro lado, también es posible que en el caso de los suelos contaminados y enmendados (día 90), la aplicación de los bioestimulantes haya ayudado a reducir la presencia de herbicidas al nivel necesario para que resulte menos tóxico para las poblaciones de bacterias Gram⁻.

Los PLFAs de hongos siempre resultaron menores en el caso de los suelos contaminados y enmendados respecto a sus respectivos controles, tanto al comienzo como al final del experimento, confirmando la toxicidad del herbicida. Se

observa un aumento de estas poblaciones en los suelos enmendados, pero este no resulta significativamente diferente de los suelos contaminados del muestreo correspondiente. Esto puede deberse a un crecimiento más lento por parte de los hongos, que los hace menos competitivos frente a las poblaciones bacterianas.

5.5.3. EVOLUCIÓN DEL IMAZAMOX EN SUELO

La persistencia de un plaguicida indica el tiempo que puede permanecer activo en el suelo dicho compuesto. El conocimiento de la persistencia de un herbicida es de gran importancia, pues da una idea del periodo en el que puede resultar tóxico sobre malas hierbas (o incluso frente a otros cultivos) y sobre la comunidad microbiana. La persistencia de un plaguicida también es importante para saber el tiempo que resulta potencialmente peligrosa su lixiviación y la contaminación de cuerpos de agua cercanos (Gianelli et al., 2014; Cassino et al., 2017). La persistencia del imazamox aumenta según lo hace el contenido en materia orgánica y arcilla (Sakaliene et al., 2007). Otras experiencias indican, además, que su adsorción aumenta a pH bajo (Mangels, 1991).

Respecto a la persistencia del imazamox en suelo, Cobucci et al., (1998) citan un tiempo de persistencia del herbicida en 26 días. Cassino et al. (2017) estudian los efectos residuales del imazamox en diferentes cultivos y obtienen tiempos de persistencia que van desde los 25 días hasta los 139, dependiendo del cultivo (trigo, colza, maíz y girasol). Vischetti et al. (2002) citan una vida media para el imazamox de entre 17,1 y 92,4 días, según las condiciones ambientales, tasa de aplicación o el tipo de suelo.

Existen pocos ejemplos de biodegradación de imidizaloninas mediante la aplicación de materia orgánica externa, pero Liu et al. (2016) aíslan una cepa de *Acinetobacter baumannii* capaz de degradar el imazamox en un producto menos tóxico para el medio ambiente, como ejemplo de biodegradación de dicho herbicida. Wang et al. (2007b) aíslan una cepa de *Arthrobacter crystallopoietes* capaz de degradar el herbicida imazaquín con gran eficiencia y, además, apuntan que esta puede ser de gran utilidad en la biodegradación de este y otros herbicidas de estructura similar, como el imazamox, en suelo o en aguas contaminadas mediante la bioaumentación. De forma similar, también se encuentran los casos de Huang et al. (2009) aíslan una cepa de *Pseudomonas sp.*, IM-4, de un suelo contaminado con

imazetapir capaz de degradar esta misma imidazolinona. Esta cepa en concreto, además, también pudo utilizar como fuente de carbono otras imidazolinonas como el imazamox, el imazapic y el imazapir, lo cual proporciona una idea de la similitud entre los distintos herbicidas y facilita las comparaciones. Sin embargo, debe procederse con precaución, ya que dicha cepa fue casi incapaz de degradar el imazaquín debido, probablemente, a las diferencias a nivel estructural entre éste y el resto de imidazolinonas.

Hay que destacar que las imidazolinonas están compuestas por una estructura básica, consistente en un anillo pentagonal nitrogenado, el imidazol, y una serie de radicales. Los herbicidas pertenecientes a esta familia pueden separarse en tres grupos de acuerdo a los radicales. El imazaquín posee un grupo quinolina; el imazametabenz y el imazametabenz-metil poseen un anillo benceno; y el resto de imidazolinonas poseen un anillo piridina, y que se diferencian por un radical unido al carbono 5. Estos radicales pueden ser un hidrógeno (imazapir), un grupo metilo (imazapic), un grupo etilo (imazetapir) y, por último, un grupo metoximetil (imazamox).

Debido a esta variedad estructural, es necesario un amplio conocimiento sobre las capacidades de los microorganismos para degradar las diversas imidazolinonas. Dentro de estos microorganismos, algunas fuentes se centran la detección y aislamiento de cepas concretas o en el desarrollo de consorcios que pueda degradar uno o varios de estos herbicidas mediante quimiotaxis (Chen et al., 2019).

Wang et al. (2007a) estudian el efecto de dos tipos de enmiendas orgánicas sobre suelos contaminados con imazaquín. Estas enmiendas fueron estiércol bovino y estiércol de pollo, no hidrolizados y no compostados. Ambas aumentaron la velocidad de degradación del herbicida. En el caso del estiércol procedente de ganado bovino, la velocidad fue 2.4 veces mayor que en el control y, en el caso del estiércol de pollo, 1.5 veces mayor. Además, también detectan un aumento de la cantidad de bacterias y hongos medidos en forma de unidades formadoras de colonias, UFCs. Este aumento de 13,5 veces el número de UFCs en el caso del suelo enmendado con estiércol bovino, y 3 veces, en el caso de los hongos.

La metodología del conteo de colonias tiene ciertas limitaciones. Aunque sea un método rápido y relativamente barato, deja fuera a organismos que no puedan

crecer en los medios seleccionados y posee un sesgo hacia los individuos con capacidad para crecer rápido, así como hacia las especies de hongos que producen gran cantidad de esporas (Kirk et al., 2004). Otros métodos, como la realización de perfiles de ácidos grasos, no cuentan con una fase de cultivo de microorganismos, sino que los extraen directamente de las muestras del suelo, y pueden resultar más adecuados (Zelles, 1999). Pese a la metodología seleccionada, las conclusiones indican que el efecto de las enmiendas orgánicas sobre las comunidades contaminadas con la imidazolinona e imazaquín es positivo.

De forma similar, Yavari et al. (2019), estudian el efecto de la adición de biochars de diversa procedencia (residuos de palma aceitera y cáscaras de arroz) a suelos contaminados con imazapic, imazapir y una combinación de ambos. Los resultados varían, pero en todos los tratamientos se encuentra una disminución de la vida media de los herbicidas y sus combinaciones por acción de las materias orgánicas adicionadas.

En la experiencia de incubación del presente trabajo se observa un aumento de la degradación del herbicida en los suelos enmendados orgánicamente. Esto puede relacionarse con la activación y mejora del estado de la comunidad microbiológica del suelo: la aplicación de bioestimulantes hidrolizados ofrece de manera rápida una serie de macro- y micronutrientes que están fácilmente disponibles para las células debido al alto grado de hidrólisis con la que estos se incorporan al suelo (Gómez et al., 2014). Además, como se ha dicho previamente, existen microorganismos capaces de usar las imidazolinonas como fuente de carbono e, incluso, como fuente de nitrógeno (Chen et al., 2019).

Orts et al. (2017) emplean okara pura, así como un hidrolizado de este producto, como potenciadores de la capacidad biorremediadora del suelo. En el trabajo citado se observa un aumento de la degradación del insecticida estudiado, clorpirifós, debido al efecto de ambos bioestimulantes aplicados. Sin embargo, es el producto hidrolizado el que lleva a una degradación más acelerada del clorpirifós. Los autores apuntan que esto es debido, probablemente, a la elevada proporción de cadenas peptídicas de bajo peso molecular (< 300 Da), condición que se ve cumplida también en el presente trabajo.

El mecanismo por el que se da un aumento de la velocidad de degradación es complejo y puede estar ligado a varios factores. Por un lado, como ya se ha

comentado, una mejora del estado nutricional de los microorganismos del suelo favorece una degradación más rápida al favorecer el crecimiento y proliferación de la comunidad nativa del suelo (Barriuso et al., 1997). Por otro lado, la adición de materia orgánica puede aumentar la adsorción de herbicidas en el suelo y disminuir la biodegradación al hacerlos menos disponibles (Gennari et al., 1998; Mechrafi et al., 2001).

Debe tenerse en cuenta también que la aplicación de herbicidas puede provocar una selección positiva hacia los microorganismos que tengan la capacidad de utilizarlos como fuentes de carbono. Esto lleva a cambios en la composición de la comunidad microbiana e incluso a aumentos en la cantidad de estas bacterias y hongos concretos. Dado que en este trabajo puede verse una disminución del número de bacterias y hongos en los tratamientos que incorporan imazamox al suelo y una disminución de las actividades enzimáticas, como la deshidrogenasa, respecto a sus respectivos controles, puede decirse que este fenómeno no ocurre, o que ocurre en una proporción menor a la inhibición provocada por la aplicación del imazamox.

Cuando se da una selección positiva hacia microorganismos con capacidad para degradar herbicidas en particular, o xenobióticos en general, se observa en el tiempo una mayor velocidad de degradación de estas especies químicas. Bundt et al. (2015) estudian la ocurrencia de este fenómeno en suelos de arroz tratados con diversas combinaciones de imidazolinonas, entre ellas el imazamox, pero no detectan que la previa aplicación de herbicidas de esta familia de compuestos permita una degradación acelerada posterior de herbicidas del mismo grupo.

En cualquier caso y en lo que respecta al presente trabajo, se observa, de forma consistente, menor cantidad del herbicida en los suelos enmendados respecto a los respectivos controles. Es decir, la adición de materias orgánicas hidrolizadas aumenta la velocidad de degradación del herbicida a través de la estimulación de la población de microorganismos del suelo.

La cantidad de imazamox entre los tratamientos S+I+OB y S+I+OF no muestra diferencias significativas ($p > 0,05$) en ningún caso, pero siempre resulta mayor en S+I+OB que en S+I+OF. Como se apuntaba en el apartado referente al herbicida oxifluorfén, el mayor contenido en cadenas peptídicas cortas y aminoácidos libres en OF (moléculas por debajo de 300 Da) puede ser el responsable de una mayor

activación de las comunidades microbianas y, por tanto, de una mayor degradación del herbicida imazamox en estos suelos.

Así pues, sobre los microorganismos del suelo, el imazamox ha demostrado ser capaz de reducir la cantidad de C microbiano y alterar los índices de diversidad, como el de Shannon (Lupwayi et al., 2011) en combinación con imazetapir, otro herbicida de la familia de las imidazolinonas, con el que es habitual su uso; o aplicado de forma aislada (Vischetti et al., 2002). Otros estudios indican que esta combinación de herbicidas, aplicada a la dosis recomendada, no tiene efectos sobre el C microbiano o la diversidad (Lupwayi et al., 2004).

Respecto a la acción de otras imidazolinonas, previamente se ha comentado la existencia de estudios que confirman la toxicidad de estas sobre la comunidad microbiana. El herbicida imazetapir afecta a diversas actividades enzimáticas cuando se aplica a tasas mayores que las recomendadas, así como a diversos índices de biodiversidad (Perucci y Scarponi, 1994; Perucci et al., 2000). Sin embargo, estos resultados contrastan con los obtenidos por Niewiadomska, (2004), en los que se observa un efecto positivo del imazetapir sobre, al menos, bacterias del género *Azotobacter* y sobre bacterias del grupo de las actinobacterias.

Esto coincide con los resultados de Sawicka (1996), que encuentra efectos positivos del mismo herbicida, imazetapir, sobre la población de actinobacterias y bacterias del género *Azotobacter*. Sin embargo, los autores concluyen que el efecto de los herbicidas depende también del tiempo (ya que el imazetapir puede inhibir el crecimiento de los microorganismos mencionados inmediatamente tras la aplicación), así como de los cultivos sobre los que se aplique e, incluso, del método. Aunque estos resultados dejan ver que el imazetapir, y por similitud, otras imidazolinonas, pueden actuar como fuentes de carbono, la metodología de este estudio y los de Perucci y Scarponi (1994) y Perucci et al. (2000) están muy centrados en la comunidad de microorganismos que rodea a las raíces en cultivos de leguminosas.

5.6. DIURÓN

5.6.1. EFECTO DEL DIURÓN SOBRE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL SUELO

A continuación, se analizarán los aspectos referentes a la toxicidad del herbicida diurón sobre las propiedades biológicas del suelo analizadas en este trabajo.

Algunos de los compuestos procedentes de su degradación, como la metilurea o la 1-(3,4-diclorofenil)urea, son también potencialmente tóxicos para el medioambiente. La fotodegradación y la degradación mediante ozonización son también procesos mediante los que el herbicida puede degradarse, además de la biodegradación (Jirkovský et al., 1997; Ramírez-Zamora, 1999; Okamura, 2002).

Como ya se ha mencionado previamente, las actividades enzimáticas del suelo son, en general, buenos indicadores de los cambios que puedan ocurrir motivados por alteraciones en el medio (cambio de manejo del suelo, aplicación de determinados fertilizantes o plaguicidas, cambios climáticos, etc.). De entre estas, la actividad fosfatasa cuenta con ciertas contraindicaciones, debido a que es común su síntesis en condiciones que no requieren necesariamente de toma de nutrientes del medio (Riccio et al., 1997; Perucci et al., 2000;). Pero la actividad deshidrogenasa, empleada en conjunto con las otras actividades enzimáticas analizadas en este trabajo, ofrece una buena idea de la actividad microbiana del suelo (García-Ruiz et al., 2008).

En este contexto, se encuentra un efecto negativo de la aplicación del herbicida diurón en el suelo estudiado sobre las actividades deshidrogenasa, fosfatasa y β -glucosidasa, pero no sobre la ureasa.

El efecto tóxico del diurón hallado en esta experiencia concuerda con los datos obtenidos por Tejada et al. (2017). En este experimento, confirman el efecto negativo del herbicida sobre tres tipos de suelo distintos: un fluvisol calcárico bajo olivar, un cambisol dístrico bajo alcornocal y pradera de gramíneas, y un fluvisol calcárico con cultivos de hortalizas. Moreno et al. (2009) también informan del efecto inhibitorio del diurón sobre la actividad deshidrogenasa, en regosoles antrópicos bajo cultivo de olivos.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Romero et al. (2010), que encuentran un efecto positivo de la adición del herbicida diurón sobre un suelo de olivar de tipo vertisol crómico. Esta estimulación de la actividad deshidrogenasa tiende a reducirse y a igualarse con el suelo control hacia el final del experimento, lo que indica que el diurón puede ser usado por los microorganismos presentes en ese suelo como fuente de carbono. Marín-Benito et al. (2018) también encuentran efectos positivos del herbicida linurón, otra urea sustituida, sobre la actividad deshidrogenasa. Por último, Grenni et al. (2009), encuentran que la aplicación de

este mismo herbicida, linurón, no muestra ningún efecto sobre la actividad deshidrogenasa, que se mantiene sin cambios respecto al suelo control a lo largo del experimento.

De nuevo, en el caso de la β -glucosidasa se encuentra una disminución de la actividad debido a la incorporación del herbicida al suelo. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Moreno et al. (2009) o los de Tejada et al. (2017). Algunos autores sugieren que, además del efecto sobre la comunidad microbiana, la sensibilidad de la β -glucosidasa puede deberse a una reducción de la actividad de la fracción extracelular más que al efecto tóxico del herbicida (Knight y Dick, 2004; Cycon et al., 2005).

El efecto tóxico del diurón también se hace patente en la inhibición de la actividad de la fosfatasa alcalina. Esta actividad permanece inhibida, además, a lo largo de todo el experimento. En experiencias previas con diurón, la actividad fosfatasa no se vio afectada por la presencia del herbicida (Tejada et al., 2017). En otras experiencias, el efecto sobre la fosfatasa alcalina de herbicidas de la misma familia, como el linurón, han demostrado ser dependientes de la dosis aplicada, así como del tiempo, pudiendo tanto estimularla como inhibirla (Cycoń et al., 2005; Cycoń et al., 2010b;).

Se puede confirmar el efecto tóxico del herbicida diurón sobre la comunidad microbiana gracias a los efectos sobre las actividades deshidrogenasa, fosfatasa y β -glucosidasa, y con el apoyo de los datos sobre la comunidad microbiana procedentes del análisis de PLFAs, que se verán a continuación. La estimulación o inhibición sobre el efecto de la deshidrogenasa y otras enzimas por efecto de diversos plaguicidas ha sido constatada en la bibliografía ampliamente. Los diferentes impactos de un plaguicida sobre la comunidad microbiana pueden estar asociados a factores como la composición de dicha comunidad, las diferencias en las características del suelo y el tipo y dosis de plaguicida (Cycoń et al., 2010a).

Al igual que se ha comprobado con los otros herbicidas estudiados, el diurón causa un efecto tóxico en la comunidad microbiana. Se observa una disminución de los PLFAs medidos de entorno al 50% en la primera toma de muestra. En la segunda toma de muestra, correspondiente al día 90, el efecto del diurón sigue patente, a pesar de haber desaparecido una gran cantidad de este producto. Esto puede deberse, como se ha mencionado con anterioridad, a la toxicidad de los productos

de degradación del herbicida (Tixier et al., 2001). En estudios de estas características y en base a la bibliografía estudiada, sería interesante un análisis complementario de los niveles de 3,4-diclorofenilurea iniciales y finales. Estudios como el citado de Tixier et al., (2001) muestran la importancia de incluir o de, al menos, tener conocimiento sobre la toxicidad de los productos de degradación de los contaminantes seleccionados.

5.6.2. CAPACIDAD BIORREMEDIADORA DE LOS BIOESTIMULANTES

Los efectos de la aplicación de ambos bioestimulantes sobre las actividades deshidrogenasa, fosfatasa y β -glucosidasa fueron positivos, al resultar en una disminución de los efectos inhibitorios del diurón. Es decir, la inhibición fue menor en suelos enmendados. El efecto estimulante de los hidrolizados parece agotarse a partir de los 20 días de iniciarse el experimento.

Respecto a la actividad deshidrogenasa, el tratamiento S+D permanece a niveles bajos incluso al final del periodo de incubación, lo cual puede relacionarse con la cantidad residual de diurón que no se ha conseguido degradar o con la toxicidad de los productos resultantes de su degradación. Lo mismo ocurre con los tratamientos enmendados (S+D+OF y S+D+OB), pero, en este caso, el valor permanece solo ligeramente por debajo del tratamiento control; es decir, que su valor al final del experimento se sitúa por debajo del control, pero por encima del suelo contaminado no enmendado. Esto puede explicarse por el efecto positivo de los hidrolizados, que han permitido una mayor degradación del herbicida; los valores del suelo control no se alcanzan debido, como ya se ha comentado, al efecto residual del diurón. Otra posibilidad es que no solo se aprecien los efectos residuales del diurón, sino que también los productos de su degradación sean tóxicos, tal y como sugieren Tixier et al. (2001). La misma tendencia se observa en el caso de la fosfatasa.

El efecto inhibitorio del diurón fue menor en los suelos enmendados con el bioestimulante OF que en los suelos enmendados con OB. Es decir, el efecto positivo de los bioestimulantes fue mayor en los suelos enmendados con OF. Esto fue así para las actividades deshidrogenasa, pero no para las actividades fosfatasa y β -glucosidasa. Como ya se ha comentado, lo primero está relacionado con la mayor proporción en moléculas de bajo peso molecular (<300 Da) del bioestimulante OF,

cuyo doble proceso de hidrólisis ha permitido una mayor liberación de estas moléculas desde el material de partida. Lo segundo puede explicarse por el mayor gasto energético que los microorganismos deben realizar para obtener los nutrientes del bioestimulante OB, en comparación con OF (Meidute et al., 2008).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por (Orts et al., 2017) en su trabajo sobre la bioestimulación con okara, en su forma pura, y con un derivado hidrolizado de este producto, en el que el bioestimulante con mayor proporción de péptidos de bajo peso molecular proporcionó una estimulación mayor y más rápida. Tendencias similares, en cuanto a la bioestimulación producida por productos con alto contenido en péptidos de bajo peso molecular, pueden encontrarse en Parrado et al., (2008), García-Martínez et al., (2010a, 2010b) y Tejada et al., (2014). La mayor proporción de péptidos de bajo peso molecular permite una disponibilidad mayor y más rápida de moléculas nitrogenadas por parte de la comunidad microbiana del suelo y así se refleja en las actividades enzimáticas (excepto la ureasa) del presente trabajo.

Respecto a la actividad ureasa, la rápida y fácil asimilación de las proteínas de bajo peso molecular puede ser el motivo por el que no se observa su estimulación tras la aplicación de los bioestimulantes. En estas condiciones, los organismos del suelo obtienen el nitrógeno de los bioestimulantes sin necesidad de emplear energía extra ni secretar una enzima que degrade compuestos nitrogenados complejos. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Rodríguez-Morgado et al., (2015b) y con los de otros autores, que encuentran la misma ausencia de estimulación en suelos enmendados con compuestos orgánicos con estas características (García-Martínez et al., 2010a; Tejada et al., 2013; Orts et al., 2017;).

Otros autores han desarrollado productos bioestimulantes con una elevada proporción de péptidos de elevado peso molecular; en estas moléculas, el nitrógeno está menos accesible (requiere más procesos de hidrólisis) y, por tanto, los microorganismos necesitan excretar enzimas para tal fin, observándose una mayor activación de la enzima ureasa (Tejada et al., 2008; Tejada et al., 2010a; Piotrowska y Wilczewski, 2012).

Por otro lado, se observa la ausencia de inhibición de la actividad ureasa en presencia del herbicida diurón. Esto están en concordancia con los resultados obtenidos por Tejada et al. (2017), en los que la aplicación del herbicida no muestra

inhibición de dicha actividad. Los autores sugieren que el diurón puede ser utilizado como sustrato de la ureasa, al tener presente una molécula de urea. Otros trabajos, sin embargo, apuntan a que el herbicida puede inhibir la actividad ureasa, como el de Liu et al. (2014). Esto contrasta con los resultados de Romero et al. (2010), que observan una estimulación de la actividad ureasa en presencia de diurón. Si embargo, Tejada et al. (2017) apuntan a que la diferencia puede deberse a la mayor tasa de aplicación del primer trabajo frente al segundo, en el que el diurón es aplicado a 5000 mg kg^{-1} , frente a los 3 mg kg^{-1} .

Los resultados aquí presentados sugieren que la aplicación de ambos bioestimulantes experimentales causó un aumento en la actividad microbiana del suelo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Parrado et al. (2008), García-Martínez et al. (2010a, b), Tejada et al. (2010b, 2013) y Rodríguez-Morgado et al., (2014) que indican que la incorporación de diferentes BS obtenidas a partir de destilados de trigo, extractos de algarroba, extracto de salvado de arroz, lodos de depuradora y plumas de pollo provoca una estimulación de la actividad microbiana del suelo. Dado que los microorganismos del suelo degradan la materia orgánica del suelo a través de la producción de una amplia variedad de enzimas extracelulares, la aplicación de ambos bioestimulantes explica el aumento de estas actividades enzimáticas.

Los resultados de los análisis de PLFAs muestran una clara bioestimulación por parte de los productos sobre las comunidades microbianas. Para la primera toma de muestra, esta estimulación es significativa en el caso de las bacterias (Gram⁺, Gram⁻ y totales), pero no lo es en para los PLFAs fúngicos (aunque se muestran siempre superiores en los suelos enmendados). En la segunda toma de muestra (día 90), la bioestimulación desaparece por el agotamiento de los recursos que proporcionaban los bioestimulantes. Cabe destacar que, en esta toma de muestra, se observa que las poblaciones fúngicas de los suelos enmendados siguen elevadas en comparación con las de los suelos control. Como se ha apuntado anteriormente, es posible que la mayor competitividad de las bacterias (mayor capacidad para aprovechar los bioestimulantes de forma rápida) sea la causante del menor aumento de la población de hongos del suelo y del retraso del mismo aumento.

5.6.3. EVOLUCIÓN DEL DIURÓN DEL SUELO

Tejada et al. (2017) informan de tiempos de vida media para el herbicida diurón de entre 28 y 41 días, lo que estaría de acuerdo con estudios previos, como los de Cullington y Walker (1999), que encuentra tiempos de entre 29 y 43 días. En este trabajo se observa una disminución progresiva del contenido en diurón en los suelos no enmendados, de manera que, transcurridos 35 días del comienzo de la incubación, la cantidad de diurón se reduce a aproximadamente la mitad. Para esa misma fecha, la cantidad de herbicida en los suelos enmendados resulta significativamente inferior, poniendo de manifiesto el efecto positivo de los bioestimulantes.

La cantidad de diurón en todas las tomas de muestra siempre resulta menor en los suelos enmendados con el bioestimulante OF que en los enmendados con el bioestimulante OB, como consecuencia del mayor contenido en péptidos de bajo peso molecular (<300Da) del primero, que proporciona una mayor activación de la comunidad microbiana, tal y como se ha explicado con anterioridad.

6. CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo de tesis, las tres experiencias de incubación han arrojado una serie de resultados, explicados y elaborados en el espacio dedicado a la discusión, y de los que se extraen las siguientes conclusiones:

1. La okara de soja resulta un buen material de partida para la fabricación de bioestimulantes mediante procesos de hidrólisis enzimática. Con las enzimas utilizadas se obtienen dos hidrolizados ricos en materia orgánica con elevada capacidad bioestimulante y biorremediadora.
2. El proceso de hidrólisis de okara de soja llevado a cabo con la enzima subtilisina produce un hidrolizado con un contenido en péptidos de bajo peso molecular relativamente alto.
3. El proceso de hidrólisis llevado a cabo mediante la combinación de las enzimas subtilisina y flavourzyme produce un hidrolizado con un contenido en péptidos de bajo peso molecular elevado. Este contenido es más alto que cuando se trata la materia prima solo con la enzima subtilisina, debido a la combinación de los efectos de ambas enzimas.
4. Los herbicidas estudiados tienen un efecto tóxico sobre las comunidades microbianas del suelo (bacterias y hongos). De la disminución de PLFAs y de la inhibición de las actividades enzimáticas analizadas puede decirse, además, que disminuyen el número de células y que afectan negativamente a los microorganismos presentes.
5. Los dos bioestimulantes producen un efecto positivo sobre el número de microorganismos del suelo y sobre las actividades enzimáticas de estos (deshidrogenasa, β -glucosidasa, fosfatasa alcalina).
6. Ninguno de los dos productos hidrolizados fue capaz de estimular la actividad ureasa. Esto es debido al alto contenido de ambos en péptidos de bajo peso molecular, que hace innecesaria la secreción de esta encima por parte de los microorganismos.
7. La bioestimulación producida por los hidrolizados OB y OF permite un aumento de la velocidad de degradación de los herbicidas oxifluorfén, imazamox y diurón y, por tanto, ambos bioestimulantes pueden servir para la biorremediación de compuestos pertenecientes a distintas familias químicas.

8. La biorremediación siempre fue mayor en los suelos enmendados con el bioestimulante OF que en los suelos enmendados con el bioestimulante OB debido a la mayor proporción de péptidos de bajo peso molecular. En consecuencia, en los suelos enmendados con OF, la cantidad final de herbicida fue menor.
9. Los resultados presentados justifican una mayor investigación sobre el uso de los bioestimulantes obtenidos a partir de okara y mediante procesos de hidrólisis enzimática en la biorremediación de los herbicidas utilizados a distintas concentraciones, así como sobre otros herbicidas de distinta composición orgánica y sobre diferentes tipos de suelo, con diversas propiedades fisicoquímicas, para establecer con precisión el efecto biorremediador de estos bioestimulantes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., y Klein, A. M. (2009). How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of Botany*, 103(9), 1579-1588. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp076>
- Alavanja, M. C. R., Hoppin, J. A., y Kamel, F. (2004). Health Effects of Chronic Pesticide Exposure: Cancer and Neurotoxicity. *Annual Review of Public Health*, 25(1), 155-197. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.25.101802.123020>
- Anastassiades, M., y Lehotay, S. J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*, 86(2). Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/844c/e3721476c3f35f32b91b718254856467e399.pdf>
- Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M. A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., Gianfreda, L. (2004). Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere*, 57(5), 401-412. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2004.06.013>
- APVMA. (2000). *Public Release Summary - Evaluation of the new active Imazamox in the products Raptor Herbicide y Raptor WG Herbicide*. Canberra. Recuperado de <https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/13816-prs-imazamox.pdf>
- Azooz, R. H., y Arshad, M. A. (1996). Soil infiltration and hydraulic conductivity under long-term no-tillage and conventional tillage systems. *Canadian Journal of Soil Science*, 76(2), 143-152. <https://doi.org/10.4141/cjss96-021>
- Bååth, E. (2003). The use of neutral lipid fatty acids to indicate the physiological conditions of soil fungi. *Microbial Ecology*, 45(4), 373-383. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-2002-y>

- Balaguer, R., Dimastrogiovanni, G., García, K., González, E., Lysimachou, A., y Romano, D. (2018). *Ríos hormonados: Amplia presencia de plaguicidas disruptores endocrinos en los ríos españoles*. Recuperado de <https://www.ecologistasenaccion.org/article35829.html>
- Bardgett, R. D., Hobbs, P. J., y Frostegård, Å. (1996). Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biology and Fertility of Soils*, 22(3), 261-264. <https://doi.org/10.1007/BF00382522>
- Barriuso, E., Houot, S., y Serra-Wittling, C. (1997). Influence of Compost Addition to Soil on the Behaviour of Herbicides. *Pesticide Science*, 49(1), 65-75. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199701\)49:1<65::AID-PS488>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199701)49:1<65::AID-PS488>3.0.CO;2-Z)
- Baruah, M., y Mishra, R. R. (1986). Effect of herbicides butachlor, 2,4-D and oxyfluorfen on enzyme activities and CO₂ evolution in submerged paddy field soil. *Plant and Soil*, 96(2), 287-291. <https://doi.org/10.1007/BF02374772>
- Bascomb, C., y Avery, B. (1982). *Soil Survey Laboratory Methods*, Soil Survey of England and Wales.
- Beck, T. H. (1984). Methods and application domain of soil microbiological analysis at the Landesanstalt fuer Bodenkultur und Pflanzenbau (LBP) in Munich for the determination of some aspects of soil fertility [Germany, Federal Republic]. In 5. *Symposium on Soil Biology, Jassy (Romania), Feb 1981*. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=R08500110>
- Bedos, C., Cellier, P., Calvet, R., Barriuso, E., y Gabrielle, B. (2002). Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: overview. *Agronomie*, 22(1), 21-33. <https://doi.org/10.1051/agro:2001003>
- Berny, P. (2007). Pesticides and the intoxication of wild animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30(2), 93-100. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00836.x>
- Blagodatskaya, E., y Kuzyakov, Y. (2013). Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry*, 67, 192-211. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.024>

- Blair, A., Zahm, S. H., Pearce, N. E., Heineman, E. F., y Fraumeni, J. F. (1992). Clues to cancer etiology from studies of farmers. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 18(4), 209-215. <https://doi.org/10.5271/sjweh.1578>
- Bolton Jr, H., Elliott, L. F., Papendick, R. I., y Bezdicsek, D. F. (1985). *Soil microbial biomass and selected soil enzyme activities: effect of fertilization and cropping practices. Soil Biol. Biochem* (Vol. 17).
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90064-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90064-1)
- Bonnet, J. L., Bonnemoy, F., Dusser, M., y Bohatier, J. (2007). Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environmental Toxicology*, 22(1), 78-91.
<https://doi.org/10.1002/tox.20237>
- Briggs, G. G. (1981). Theoretical and Experimental Relationships between Soil Adsorption, Octanol-Water Partition Coefficients, Water Solubilities, Bioconcentration Factors, and the Parachor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(5), 1050-1059. <https://doi.org/10.1021/jf00107a040>
- Bundt, A. C., Avila, L. A., Pivetta, A., Agostinetto, D., Dick, D. P., y Burauel, P. (2015). Imidazolinone Degradation in Soil in Response to Application History. *Planta Daninha*, 33(2), 341-349.
<https://doi.org/10.1590/0100-83582015000200020>
- Burns, R. G. (1982). Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 14(5), 423-427.
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(82\)90099-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(82)90099-2)
- Burrows, H. D., Canle L, M., Santaballa, J. A., y Steenken, S. (2002). Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 67(2), 71-108.
[https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(02\)00277-4](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(02)00277-4)
- Cabrera, A., Celis, R., y Herмосín, M. C. (2016). Imazamox-clay complexes with chitosan- and iron (III)-modified smectites and their use in nanoformulations. *Pest Management Science*, 72(7), 1285-1294. <https://doi.org/10.1002/ps.4106>
- Calderón, M. J., Real Ojeda, M., Cornejo, J., y Herмосín, M. C. (2011). Comportamiento de oxifluorfen en dos suelos andaluces dedicados al cultivo del olivar: estudio de laboratorio. Recuperado de <https://digital.csic.es/handle/10261/41394>

- Calderón, M. J. (2017). Diferentes estrategias para minimizar la contaminación por plaguicidas de aguas superficiales y subterráneas en zonas olivereras. Recuperado de <https://idus.us.es/xmlui/handle//11441/73200>
- Calvet, R. (1989). Adsorption of organic chemicals in soils. *Environmental Health Perspectives*, 83, 145-177. <https://doi.org/10.1289/ehp.8983145>
- Cartagena Causapé, M. C. (2005). Problemática de la aplicación de biosólidos al suelo agrícola: Los compuestos orgánicos. *Phytoma*, (169). Recuperado de <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/169-mayo-2005/problemtica-de-la-aplicacin-de-bioslidos-al-suelo-agrcola-los-compuestos-orgnicos>
- Cassino, N., Bedmar, F., Monterubbianesi, G., y Gianelli, V. (2017). Efectos residuales de Imazamox sobre cultivos de invierno y de verano en Argentina. *Ciencias Agronómicas*, 23-29.
- Cessna, A. J., Elliott, J. A., y Bailey, J. (2012). Leaching of Three Imidazolinone Herbicides during Sprinkler Irrigation. *Journal of Environment Quality*, 41(3), 882. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0198>
- Chen, D., Liu, S.-J., y Du, W. (2019). Chemotactic screening of imidazolinone-degrading bacteria by microfluidic SlipChip. *Journal of Hazardous Materials*, 366, 512-519. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2018.12.029>
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., y Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*, 33(6), 745-755. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.003>
- Choi, I. S., Kim, Y. G., Jung, J. K., y Bae, H.-J. (2015). Soybean waste (okara) as a valorization biomass for the bioethanol production. *Energy*, 93, 1742-1747. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2015.09.093>
- Choudhury, P. P., Singh, R., Ghosh, D., y Sharma, A. R. (2016). *Herbicide Use in Indian Agriculture*. Jabalpur, Madhya Pradesh,. Recuperado de [https://krishi.icar.gov.in/jspui/bitstream/123456789/614/1/Information Bulletin No - 22 - Herbicide Use in Indian Agriculture.pdf](https://krishi.icar.gov.in/jspui/bitstream/123456789/614/1/Information%20Bulletin%20No%20-%2022%20-%20Herbicide%20Use%20in%20Indian%20Agriculture.pdf)

- Clemente, A., Sánchez-Vioque, R., Vioque, J., Bautista, J., y Millán, F. (1997). Chemical composition of extracted dried olive pomaces containing two and three phases. *Food Biotechnology*, 11(3), 273-291.
<https://doi.org/10.1080/08905439709549936>
- Clemente, A., Vioque, J., Sanchez-Vioque, R., Pedroche, J., y Millán, F. (1999). Production of Extensive Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Protein Hydrolysates with Reduced Antigenic Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3776-3781. <https://doi.org/10.1021/jf981315p>
- Cobucci, T., Prates, H. T., Falcão, C. L. M., y Rezende, M. M. V. (1998). Effect of Imazamox, Fomesafen, and Acifluorfen Soil Residue on Rotational Crops. *Weed Science*. Cambridge University Press Weed Science Society of America.
<https://doi.org/10.2307/4045945>
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., y Roupheal, Y. (2015). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.037>
- Cox, L., Hermosin, M. C., y Cornejo, J. (1995). Adsorption and Desorption of the Herbicide Thiazafuron as A Function of Soil Properties. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 58(1-4), 305-314.
<https://doi.org/10.1080/03067319508033132>
- Cox, L., Velarde, P., Cabrera, A., Hermosín, M. C., y Cornejo, J. (2007). Dissolved organic carbon interactions with sorption and leaching of diuron in organic-amended soils. *European Journal of Soil Science*, 58(3), 714-721.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2006.00856.x>
- Cullington, J. E., y Walker, A. (1999). Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(5), 677-686. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00156-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00156-4)
- Cycoń, N., Piotrowska-Seget, Z., y Kaczynska, A. (2005). Soil enzyme activities as indicator of soil pollution by pesticides. *Pestycydy*, 11(17), 35-45. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/248393908>
- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., y Kozdrój, J. (2010a). Dehydrogenase activity as an indicator of different microbial responses to pesticide-treated soils. *Chemistry and Ecology*, 26(4), 243-250.
<https://doi.org/10.1080/02757540.2010.495062>

- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., y Kozdrój, J. (2010b). Linuron effects on microbiological characteristics of sandy soils as determined in a pot study. *Annals of Microbiology*, 60(3), 439-449.
<https://doi.org/10.1007/s13213-010-0061-0>
- Das, A. C., Debnath, A., y Mukherjee, D. (2003). Effect of the herbicides oxadiazon and oxyfluorfen on phosphates solubilizing microorganisms and their persistence in rice fields. *Chemosphere*, 53(3), 217-221.
[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00440-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00440-5)
- Delgado-Moreno, L., y Peña, A. (2009). Compost and vermicompost of olive cake to bioremediate triazines-contaminated soil. *Science of The Total Environment*, 407(5), 1489-1495. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2008.10.047>
- Desai, N. C., Bhavsar, A. M., y Baldaniya, B. B. (2009). Synthesis and Antimicrobial Activity of 5-Imidazolinone Derivatives. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(1), 90. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.51953>
- Dolaptsoglou, C., Karpouzas, D. G., Menkissoglu-Spiroudi, U., Eleftherohorinos, I., y Voudrias, E. A. (2007). Influence of Different Organic Amendments on the Degradation, Metabolism, and Adsorption of Terbutylazine. *Journal of Environment Quality*, 36(6), 1793. <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0388>
- Doran, J. W., Coleman, D. C., Bezdicsek, D. F., Stewart, B. A., y Dick, R. P. (1994). Soil Enzyme Activities as Indicators of Soil Quality. En *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment* (Vol. sssaspecialpubl, pp. 107-124). Soil Science Society of America and American Society of Agronomy.
<https://doi.org/10.2136/sssaspecpub35.c7>
- Doran, J. W., y Parkin, T. B. (1994). Defining and Assessing Soil Quality. En J. W. Doran, D. C. Coleman, D. F. Bezdicsek, B. A. Stewart, J. W. Doran, y T. B. Parkin (Eds.), *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment* (Vol. sssaspecial, pp. 1-21). Soil Science Society of America and American Society of Agronomy.
<https://doi.org/10.2136/sssaspecpub35.c1>
- Doran, J. W., Jones, A. J., Dick, R. P., Breakwell, D. P., y Turco, R. F. (1996). Soil Enzyme Activities and Biodiversity Measurements as Integrative Microbiological Indicators. En *Methods for Assessing Soil Quality* (pp. 247-271). Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2136/sssaspecpub49.c15>

- Doyle, R. C., Kaufman, D. D., y Burt, G. W. (1978). Effect of dairy manure and sewage sludge on ¹⁴C-pesticide degradation in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(4), 987-989. <https://doi.org/10.1021/jf60218a008>
- Doyle, R. C., Kaufman, D. D., Burt, G. W., y Douglass, L. (1981). Degradation of cis-permethrin in soil amended with sewage sludge or dairy manure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(2), 412-414. <https://doi.org/10.1021/jf00104a047>
- DuBois, M., Smith, F., Rebers, P. A., Gilles, K. A., y Hamilton, J. K. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Duggleby, R. G., McCourt, J. A., y Guddat, L. W. (2008). Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3), 309-324. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2007.12.004>
- Dungait, J. A. J., Kemmitt, S. J., Michallon, L., Guo, S., Wen, Q., Brookes, P. C., y Evershed, R. P. (2011). Variable responses of the soil microbial biomass to trace concentrations of ¹³C-labelled glucose, using ¹³C-PLFA analysis. *European Journal of Soil Science*, 62(1), 117-126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2010.01321.x>
- Dungan, R. S., y Yates, S. R. (2003). Degradation of Fumigant Pesticides. *Vadose Zone Journal*, 2(3), 279. <https://doi.org/10.2136/vzj2003.2790>
- Dzantor, E. K., Felsot, A. S., y Beck, M. J. (1993). Bioremediating herbicide-contaminated soils. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 39-40(1), 621-630. <https://doi.org/10.1007/BF02919023>
- Eichner, C. A., Erb, R. W., Timmis, K. N., & Wagner-Döbler, I. (1999). Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(1), 102-109. Recuperado de <https://aem.asm.org/content/65/1/102>
- Eivazi, F., y Tabatabai, M. A. (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(5), 601-606. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90141-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90141-1)
- Engel, L. S. (2005). Pesticide Use and Breast Cancer Risk among Farmers' Wives in the Agricultural Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 161(2), 121-135. <https://doi.org/10.1093/aje/kwi022>

- EPA. (2002). *Reregistration Eligibility Decision (RED) for Oxyfluorfen*. Recuperado de <http://bit.ly/2RLXIVP>
- European Commission. (2018). EU Pesticides database: Diuron. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1271>
- Fadayomi, O., y Warren, G. F. (1977). Uptake and Translocation of Nitrofen and Oxyfluorfen. *Weed Science*, 25(02), 111-114.
<https://doi.org/10.1017/S0043174500033063>
- FAO, (1989). *Carte mondiale des sols* (Vol. 60). Food & Agriculture Org. Recuperado de <http://bit.ly/2JfDUGo>
- FAO, (2014). Environment and Social Standard 5 (E & SS5). Pest and Pesticide Management. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-bt566e.pdf>
- Federle, T. W., Dobbins, D. C., Thornton-Manning, J. R., y Jones, D. D. (1986). Microbial Biomass, Activity, and Community Structure in Subsurface Soils. *Ground Water*, 24(3), 365-374.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.1986.tb01013.x>
- Felsot, A. S., y Dzantor, E. . (1990). Enhancing biodegradation for detoxification of herbicide waste in soil. *ACS Symposium series - American Chemical Society (USA)*, 195. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9328201>
- Felsot, A. S., y Dzantor, E. K. (1992). Enhancing biodegradation for detoxification of herbicide waste in soil. *ACS Symposium series - American Chemical Society (USA)*, 195. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9328201>
- Findlay, R. H., King, G. M., y Watling, L. (1989). Efficacy of phospholipid analysis in determining microbial biomass in sediments. *Applied and environmental microbiology*, 55(11), 2888-2893. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16348051>
- Flury, M. (1996). Experimental Evidence of Transport of Pesticides through Field Soils—A Review. *Journal of Environment Quality*, 25(1), 25.
<https://doi.org/10.2134/jeq1996.00472425002500010005x>
- Fox, J., Weisberg, S., y Fox, J. (2011). *An R companion to applied regression*. Recuperado de <http://bit.ly/2YtuT2U>

- Franco-Andreu, L., Gómez, I., Parrado, J., García, C., Hernández, T., y Tejada, M. (2016). Behavior of two pesticides in a soil subjected to severe drought. Effects on soil biology. *Applied Soil Ecology*, 105, 17-24.
<https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2016.04.001>
- Franco-Andreu, L., Gómez, I., Parrado, J., García, C., Hernández, T., y Tejada, M. (2017). Soil Biology Changes as a Consequence of Organic Amendments Subjected to a Severe Drought. *Land Degradation and Development*, 28(3), 897-905. <https://doi.org/10.1002/ldr.2663>
- Freemark, K. (1995). Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: A review with special reference to North America. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 52(2-3), 67-91.
[https://doi.org/10.1016/0167-8809\(94\)00534-L](https://doi.org/10.1016/0167-8809(94)00534-L)
- Frommberger, M., Martens, D., Kettrup, A., Schmitt-Kopplin, P., Gaspar, A., El Azzouzi, M., y Harir, M. (2007). Characterization of imazamox degradation by-products by using liquid chromatography mass spectrometry and high-resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(5), 1459-1467.
<https://doi.org/10.1007/s00216-007-1343-7>
- Frostegård, Å., Bååth, E., y Tunlio, A. (1993). Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 25(6), 723-730.
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90113-P](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90113-P)
- García-Martínez, A. M., Díaz, A., Tejada, M., Bautista, J., Rodríguez, B., Santa María, C., Parrado, J. (2010a). Enzymatic production of an organic soil biostimulant from wheat-condensed distiller solubles: Effects on soil biochemistry and biodiversity. *Process Biochemistry*, 45(7), 1127-1133.
<https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2010.04.005>
- García-Martínez, A. M., Tejada, M., Díaz, A. I., Rodríguez-Morgado, B., Bautista, J., y Parrado, J. (2010b). Enzymatic vegetable organic extracts as soil biochemical biostimulants and atrazine extenders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9697-9704. <https://doi.org/10.1021/jf101289n>

- García-Orenes, F., Guerrero, C., Roldán, A., Mataix-Solera, J., Cerdà, A., Campoy, M., ... Caravaca, F. (2010). Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. *Soil and Tillage Research*, 109(2), 110-115.
<https://doi.org/10.1016/J.STILL.2010.05.005>
- García-Ruiz, R., Ochoa, V., Hinojosa, M. B., y Carreira, J. A. (2008). Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2137-2145.
<https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2008.03.023>
- García, C., Hernandez, T., y Costa, F. (1997a). Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 28(1-2), 123-134.
<https://doi.org/10.1080/00103629709369777>
- García, C., Hernandez, T., y Costa, F. (1997b). Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 28(1-2), 123-134.
<https://doi.org/10.1080/00103629709369777>
- García, C., Hernández, T., y Costa, F. (1990). Study of water extract of sewage sludge compost. *Soil Science Plant and Nutrition*, 37, 399-408.
<https://doi.org/10.1080/00380768.1991.10415052>
- García, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B., y Masciandaro, G. (1993). The dehydrogenase activity of soil as an ecological marker in processes of perturbed system regeneration. En *XI international symposium environmental Biogeochemistry*. Salamanca, Spain (Vol. 27, pp. 89-100).
- Gennari, M., Negre, M., y Vindrola, D. (1998). Adsorption of the herbicides imazapyr, emazethapyr and imazaquin on soils and humic acids. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 33(5), 547-567.
<https://doi.org/10.1080/03601239809373162>
- Gianelli, V. R., Bedmar, F., y Costa, J. L. (2014). Persistence and sorption of imazapyr in three Argentinean soils. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(1), 29-34. <https://doi.org/10.1002/etc.2400>

- Gianfreda, L., y Rao, M. A. (2008). Interactions Between Xenobiotics and Microbial and Enzymatic Soil Activity. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 38(4), 269-310. <https://doi.org/10.1080/10643380701413526>
- Giles, C. H., MacEwan, T. H., Nakhwa, S. N., y Smith, D. (1960). 786. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, (0), 3973. <https://doi.org/10.1039/jr9600003973>
- Gómez, I., Rodríguez-Morgado, B., Parrado, J., García, C., Hernández, T., y Tejada, M. (2014). Behavior of oxyfluorfen in soils amended with different sources of organic matter. Effects on soil biology. *Journal of Hazardous Materials*, 273, 207-214. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.051>
- González-Pradas, E., Socías-Viciana, M. M., Fernández-Pérez, M., Villafranca-Sánchez, M., y Flores-Céspedes, F. (1999). Sorption and Leaching of Atrazine and MCPA in Natural and Peat-Amended Calcareous Soils from Spain. <https://doi.org/10.1021/JF980799M>
- Goyal, S., Chander, K., Mundra, M. C., y Kapoor, K. K. (1999). *Influence of inorganic fertilizers and organic amendments on soil organic matter and soil microbial properties under tropical conditions*. *Biol Fertil Soils* (Vol. 29). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/s003740050544>
- Grenni, P., Caracciolo, A. B., Rodríguez-Cruz, M. S., y Sánchez-Martín, M. J. (2009). Changes in the microbial activity in a soil amended with oak and pine residues and treated with linuron herbicide. *Applied Soil Ecology*, 41(1), 2-7. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.07.006>
- Grenni, Paola, Rodríguez-Cruz, M. S., Herrero-Hernández, E., Marín-Benito, J. M., Sánchez-Martín, M. J., y Barra Caracciolo, A. (2012). Effects of Wood Amendments on the Degradation of Terbutylazine and on Soil Microbial Community Activity in a Clay Loam Soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(8), 5401-5412. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1289-z>
- Gutián, F., y Carballas, T. (1976). *Técnicas de análisis de suelos*. Pico Sacro. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10261/59235>

- Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., y Yermiyahu, U. (2015). *The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake. Advances in Agronomy* (Vol. 130). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2014.10.001>
- Hartley, G. S. (1960). Physico-chemical aspects of the availability of herbicides in soils. *Herbicides and the soil*, 63-78.
Recuperado de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19621900465>
- Hass, U., Boberg, J., Christiansen, S., Jacobsen, P. R., Vinggaard, A. M., Taxvig, C., Axelstad, M. (2012). Adverse effects on sexual development in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reproductive Toxicology*, 34(2), 261-274.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.090>
- Helling, C. S., Kearney, P. C., y Alexander, M. (1971). Behavior of Pesticides in Soils. *Advances in Agronomy*, 23, 147-240.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60153-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60153-4)
- Hothorn, T., Bretz, F., y Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*, 50(3), 346-363.
<https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>
- Huang, X., Pan, J., Liang, B., Sun, J., Zhao, Y., y Li, S. (2009). Isolation, Characterization of a Strain Capable of Degrading Imazethapyr and Its Use in Degradation of the Herbicide in Soil. *Current Microbiology*, 59(4), 363-367.
<https://doi.org/10.1007/s00284-009-9442-7>
- Humburg, N. E., Colby, S. R., Weed Science Society of America., & Weed Science Society of America. Herbicide Handbook Committee. (1989). *Herbicide handbook of the Weed Science Society of America*. The Society. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19910089948>
- Hussain, S., Siddique, T., Saleem, M., Arshad, M., y Khalid, A. (2009). Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions. En *Advances in Agronomy* (1.^a ed., Vol. 102, pp. 159-200). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(09\)01005-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(09)01005-0)
- Imfeld, G., y Vuilleumier, S. (2012). Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. *European Journal of Soil Biology*, 49, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.11.010>

- Janaki, P., Sathya Priya, R., y Chinnusamy, C. (2013). Field dissipation of oxyfluorfen in onion and its dynamics in soil under Indian tropical conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48(11), 941-947.
<https://doi.org/10.1080/03601234.2013.816599>
- Jirkovský, J., Faure, V., y Boule, P. (1997). Photolysis of Diuron. *Pesticide Science*, 50(1), 42-52.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199705\)50:1<42::AID-PS557>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199705)50:1<42::AID-PS557>3.0.CO;2-W)
- Kah, M., y Brown, C. D. (2006). Adsorption of Ionisable Pesticides in Soils (pp. 149-217). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-32964-2_5
- Kandeler, E., y Gerber, H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 6(1), 68-72. <https://doi.org/10.1007/BF00257924>
- Karlen, D. L., y Stott, D. E. (1994). A Framework for Evaluating Physical and Chemical Indicators of Soil Quality. En J. W. Doran, D. C. Coleman, D. F. Bezdicek, B. A. Stewart, D. L. Karlen, y D. E. Stott (Eds.), *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment* (Vol. sssaspecia, pp. 53-72). Soil Science Society of America and American Society of Agronomy. <https://doi.org/10.2136/sssaspecpub35.c4>
- Karlen, D. L., Mausbach, M. J., Doran, J. W., Cline, R. G., Harris, R. F., y Schuman, G. E. (1997). Soil Quality: A Concept, Definition, and Framework for Evaluation (A Guest Editorial). *Soil Science Society of America Journal*, 61(1), 4.
<https://doi.org/10.2136/sssaj1997.03615995006100010001x>
- Katagi, T. (2004). Photodegradation of pesticides on plant and soil surfaces. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 182, 1-189.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9098-3_1
- Kenaga, E., y Goring, C. (1980). Relationship Between Water Solubility, Soil Sorption, Octanol-Water Partitioning, and Concentration of Chemicals in Biota. En *Aquatic Toxicology* (pp. 78-78-38). 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959: ASTM International.
<https://doi.org/10.1520/STP27410S>

- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., y Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58(2), 169-188.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.04.006>
- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., y Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303-313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Knight, T. R., y Dick, R. P. (2004). Differentiating microbial and stabilized β -glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(12), 2089-2096. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2004.06.007>
- Koeppel, M. K., y Lichtenstein, P. E. (1984). Effects of Organic Fertilizers on the Fate of ^{14}C Carbofuran in an Agro-microcosm Under Soil Run-off Conditions. *Journal of Economic Entomology*, 77(5), 1116-1122.
<https://doi.org/10.1093/jee/77.5.1116>
- Kononova, M. M. (1961). Soil organic matter, its nature, its role in soil formation and in soil fertility. *Soil organic matter, its nature, its role in soil formation and in soil fertility*. Recuperado de
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19610604629>
- Konstantinou, I. K., Zarkadis, A. K., y Albanis, T. A. (2001). Photodegradation of Selected Herbicides in Various Natural Waters and Soils under Environmental Conditions. *Journal of Environment Quality*, 30(1), 121.
<https://doi.org/10.2134/jeq2001.301121x>
- Kookana, R. S. (2010). The role of biochar in modifying the environmental fate, bioavailability, and efficacy of pesticides in soils: a review. *Soil Research*, 48(7), 627. <https://doi.org/10.1071/SR10007>
- Lambert, S. M. (1967). Functional Relation between Sorption in Soil and Chemical Structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15(4), 572-576.
<https://doi.org/10.1021/jf60152a024>
- Limousin, G., Gaudet, J.-P., Charlet, L., Szenknect, S., Barthès, V., y Krimissa, M. (2007). Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry*, 22(2), 249-275.
<https://doi.org/10.1016/J.APGEOCHEM.2006.09.010>

- Liu, W., Yao, J., Cai, M., Chai, H., Zhang, C., Sun, J., Masakorala, K. (2014). Synthesis of a novel nanopesticide and its potential toxic effect on soil microbial activity. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(11), 2677.
<https://doi.org/10.1007/s11051-014-2677-7>
- Liu, C., Yang, X., Lai, Y., Lu, H., Zeng, W., Geng, G., y Yang, F. (2016). Imazamox microbial degradation by common clinical bacteria: *Acinetobacter baumannii* IB5 isolated from black soil in China shows high potency. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(8), 1798-1807.
[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61344-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61344-8)
- Lupwayi, N. Z., Harker, K. N., Clayton, G. W., Turkington, T. K., Rice, W. A., y O'Donovan, J. T. (2004). Soil microbial biomass and diversity after herbicide application. *Canadian journal of plant science*, 84(2), 677-685. <https://doi.org/10.4141/P03-121>
- Magdoff, F. R., Tabatabai, M. A., y Hanlon, E. A. (1996). Soil Organic Matter Testing: An Overview. En Soil Science Society of America (Ed.), *Biology and Fertility of Soils* (Vol. 28, pp. 343-351). Ames, Iowa: Iowa State University.
<https://doi.org/10.2136/sssaspepub46.c1>
- Malato, S., Cáceres, J. C., Fernández-Alba, A. R., Piedra, L., Agüera, A., y Vial, J. (2003). Photocatalytic Treatment of Diuron by Solar Photocatalysis: Evaluation of Main Intermediates and Toxicity. *Environ. Sci. Technol.*, 37(11), 2516-2524.
<https://doi.org/10.1021/es0261170>
- Mangels, G. (1991). Behavior of the Imidazolinone Herbicides in Soil — A Review of the Literature, 191-210. <https://doi.org/10.1201/9780203709993-16>
- MAPA. (1994). *Métodos Oficiales de Análisis, Tomo III* (Ministerio). Madrid, España.
- Marín-Benito, J. M., Alletto, L., Barriuso, E., Bedos, C., Benoit, P., Pot, V., y Mamy, L. (2018). Pesticide fate modelling in conservation tillage: Simulating the effect of mulch and cover crop on S-metolachlor leaching. *Science of the Total Environment*, 628-629, 1508-1517.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.144>
- Marschner, P., Kandeler, E., y Marschner, B. (2003). Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(3), 453-461.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00297-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00297-3)

- Mechrafi, E., Dahchour, A., y Bouhaouss, A. (2001). Effect of different amendments on the mobility of triflusaluron methyl and imazapyr in Moroccan soil. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 21(4), 241-246.
Recuperado de
https://www.agrimaroc.org/index.php/Actes_IAVH2/article/view/163
- Meidute, S., Demoling, F., & Bååth, E. (2008). Antagonistic and synergistic effects of fungal and bacterial growth in soil after adding different carbon and nitrogen sources. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2334-2343.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.011>
- Metz, J. G., Pakrasi, H. B., Seibert, M., y Arntzer, C. J. (1986). Evidence for a dual function of the herbicide-binding D1 protein in photosystem II. *FEBS Letters*, 205(2), 269-274. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80911-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80911-5)
- Meyer, A., Chrisman, J., Moreira, J. C., y Koifman, S. (2003). Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Research*, 93(3), 264-271.
[https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(03\)00065-3](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(03)00065-3)
- Miller, M. N., Stratton, G. W., y Murray, G. (2004). Effects of Nutrient Amendments and Temperature on the Biodegradation of Pentachlorophenol Contaminated Soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 151(1-4), 87-101.
<https://doi.org/10.1023/B:WATE.0000009903.22105.30>
- Miranda-Filho, A. L., Monteiro, G. T. R., y Meyer, A. (2012). Brain cancer mortality among farm workers of the State of Rio de Janeiro, Brazil: A population-based case-control study, 1996-2005. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 215(5), 496-501.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.10.007>
- Moorman, T. B., Cowan, J. K., Arthur, E. L., y Coats, J. R. (2001). Organic amendments to enhance herbicide biodegradation in contaminated soils. *Biology and Fertility of Soils*, 33(6), 541-545. <https://doi.org/10.1007/s003740100367>
- Moreno, B., García-Rodríguez, S., Cañizares, R., Castro, J., y Benítez, E. (2009). Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 131(3-4), 333-339. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2009.02.011>
- Mungai, N. W., Motavalli, P. P., Kremer, R. J., y Nelson, K. A. (2005). Spatial variation

of soil enzyme activities and microbial functional diversity in temperate alley cropping systems. *Biology and Fertility of Soils*, 42(2), 129-136.
<https://doi.org/10.1007/s00374-005-0005-1>

- Niemi, R. M., Vepsäläinen, M., Wallenius, K., Simpanen, S., Alakukku, L., y Pietola, L. (2005). Temporal and soil depth-related variation in soil enzyme activities and in root growth of red clover (*Trifolium pratense*) and timothy (*Phleum pratense*) in the field. *Applied Soil Ecology*, 30(2), 113-125.
<https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2005.02.003>
- Niewiadomska, A. (2004). Effect of carbendazim, imazetapir and thiram on nitrogenase activity, the number of microorganisms in soil and yield of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Polish Journal of Environmental Studies*, 13(4), 403-410. Recuperado de [bwmeta1.element.agro-article-75525a1c-0161-4a02-bf21-089146283cf2](https://www.bwmeta1.element.agro-article-75525a1c-0161-4a02-bf21-089146283cf2)
- Noble, A. (1993). Review Partition coefficients (n-octanol-water). *Journal of Chromatography A*, 642, 3-14.
[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80072-G](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80072-G)
- O'Toole, D. K. (1999). Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk Production: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 363-371. <https://doi.org/10.1021/jf980754l>
- Okamura, H. (2002). Photodegradation of the antifouling compounds Irgarol 1051 and Diuron released from a commercial antifouling paint. *Chemosphere*, 48(1), 43-50. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00025-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00025-5)
- Orts, A., Cabrera, S., Gómez, I., Parrado, J., Rodriguez-Morgado, B., y Tejada, M. (2017). Use of okara in the bioremediation of chlorpyrifos in soil: Effects on soil biochemical properties. *Applied Soil Ecology*, 121(September), 172-176.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.042>
- Orts, A., Tejada, M., Parrado, J., Paneque, P., García, C., Hernández, T., y Gómez-Parrales, I. (2018). Production of biostimulants from okara through enzymatic hydrolysis and fermentation with *Bacillus licheniformis* : comparative effect on soil biological properties. *Environmental Technology*, 1-12.
<https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1436596>
- Osgerby, J. M. (1970). Sorption of un-ionised pesticides by soils. «*Sorption and Transport Processes in Soils*». *Monogr. Soc. Chem. Ind.*, (37), 63-78. Recuperado de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19711905115>

- Özkanca, R., y Flint, K. P. (1997). Relationship between respiratory enzymes and survival of *Escherichia coli* under starvation stress in lake water. *Journal of Applied Microbiology*, 82(3), 301-309.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00360.x>
- Parrado, J., Bautista, J., Romero, E. J., García-Martínez, A. M., Friaiza, V., y Tejada, M. (2008). Production of a carob enzymatic extract: Potential use as a biofertilizer. *Bioresource Technology*, 99(7), 2312-2318.
<https://doi.org/10.1016/j.BIORTECH.2007.05.029>
- Perrin-Ganier, C., Schiavon, F., Morel, J.-L., y Schiavon, M. (2001). Effect of sludge-amendment or nutrient addition on the biodegradation of the herbicide isoproturon in soil. *Chemosphere*, 44(4), 887-892.
[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00283-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00283-6)
- Perucci, P. (1992). Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. *Biology and Fertility of Soils*, 14(1), 54-60.
<https://doi.org/10.1007/BF00336303>
- Perucci, P., y Scarponi, L. (1994). Effects of the herbicide imazethapyr on soil microbial biomass and various soil enzyme activities. *Biology and Fertility of Soils*, 17(3), 237-240. <https://doi.org/10.1007/BF00336329>
- Perucci, P., Dumontet, S., Bufo, S. A., Mazzatura, A., y Casucci, C. (2000). Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils*, 32(1), 17-23. <https://doi.org/10.1007/s003740000207>
- Pfenning, M., y Se, B. (2008). *The CLEARFIELD® technology-A new broad-spectrum post-emergence weed control system for European sunflower growers. Article in Journal of Plant Diseases and Protection*. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/236172130>
- Phytoma. (2018). Murcia adopta medidas en las aplicaciones de herbicidas con oxifluorfen. Recuperado el 7 de abril de 2019, de <https://www.phytoma.com/noticias/noticias-de-actualidad/murcia-adopta-medidas-en-las-aplicaciones-de-herbicidas-con-oxifluorfen>
- Pillai, S. D., Josephson, K. L., Bailey, R. L., Gerba, C. P., y Pepper, I. L. (1991). Rapid method for processing soil samples for polymerase chain reaction amplification of specific gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8), 2283-2286. Recuperado de <https://aem.asm.org/content/57/8/2283.short>

- Pimentel, D. (1994). Insect population responses to environmental stress and pollutants. *Environmental Review*, 2, 1-15. <https://doi.org/10.1139/F03-011>
- Pimentel, D., y Burgess, M. (2005). Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Integrated Pest Management*, 3, 47-71. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7796-5_2
- Piotrowska, A., y Wilczewski, E. (2012). Effects of catch crops cultivated for green manure and mineral nitrogen fertilization on soil enzyme activities and chemical properties. *Geoderma*, 189-190, 72-80.
<https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2012.04.018>
- Printz, H., Burauel, P., y Fuhr, F. (1995). Effect of organic amendment on degradation and formation of bound residues of methabenzthiazuron in soil under constant climatic conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 30(4), 435-456. <https://doi.org/10.1080/03601239509372946>
- Qian, H., Hu, B., Wang, Z., Xu, X., y Hong, T. (2007). Effects of validamycin on some enzymatic activities in soil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 125(1-3), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-9211-z>
- R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
<https://www.R-project.org>
- Ramírez-Zamora, R. M. (1999). Identification of diuron radical oxidation by-products. *Revue des Sciences de l'Eau*, 12(3), 545-560. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR2000001460>
- Renella, G., Mench, M., Gelsomino, A., Landi, L., y Nannipieri, P. (2005). Functional activity and microbial community structure in soils amended with bimetallic sludges. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(8), 1498-1506.
<https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2005.01.013>
- Riccio, M. L., Rossolini, G. M., Lombardi, G., Chiesurin, A., y Satta, G. (1997). Expression cloning of different bacterial phosphatase encoding genes by histochemical screening of genomic libraries onto an indicator medium containing phenolphthalein diphosphate and methyl green. *Journal of Applied Microbiology*, 82(2), 177-185.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1997.tb03570.x>

- Richter, E. D. (2002). Acute human pesticide poisonings. En D Pimentel (Ed.), *Encyclopedia of Pest Management* (Dekker, pp. 3-6). New York.
- Ricketts, T. H., Regetz, J., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., Bogdanski, A., Viana, B. F. (2008). Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecology Letters*, 11(5), 499-515. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01157.x>
- Rodale Institute, (1991). Conference on Assessment & Monitoring of Soil Quality: July 11-13, 1991. Emmaus, Pa.: Rodale Institute. Recuperado de <file://catalog.hathitrust.org/Record/007973209>
- Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., Parrado, J., y Tejada, M. (2014). Behaviour of oxyfluorfen in soils amended with edaphic biostimulants/biofertilizers obtained from sewage sludge and chicken feathers. Effects on soil biological properties. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(18), 11027-11035. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3040-3>
- Rodríguez-Morgado, B., Gomez, I., Parrado, J., García-Martínez, A. M., Aragón, C., y Tejada, M. (2015a). Obtaining edaphic biostimulants/biofertilizers from different sewage sludges. Effects on soil biological properties. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 36(17), 2217-2226. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1024760>
- Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., Parrado, J., García, C., Hernández, T., y Tejada, M. (2015b). Accelerated degradation of PAHs using edaphic biostimulants obtained from sewage sludge and chicken feathers. *Journal of Hazardous Materials*, 300, 235-242. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.045>
- Romero, E., Bautista, J., García-Martínez, A. M., Cremades, O., y Parrado, J. (2007). Bioconversion of corn distiller's dried grains with solubles (CDDGS) to extracellular proteases and peptones. *Process Biochemistry*, 42(11), 1492-1497. <https://doi.org/10.1016/j.PROCBIO.2007.07.012>
- Romero, E., Matallo, M. ., Peña, A., Sánchez-Rasero, F., Schmitt-Kopplin, P., y Dios, G. (2001). Dissipation of racemic mecoprop and dichlorprop and their pure R-enantiomers in three calcareous soils with and without peat addition. *Environmental Pollution*, 111(2), 209-215. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00073-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00073-7)

- Romero, E., Fernández-Bayo, J., Díaz, J. M. C., y Nogales, R. (2010). Enzyme activities and diuron persistence in soil amended with vermicompost derived from spent grape marc and treated with urea. *Applied Soil Ecology*, 44(3), 198-204. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.12.006>
- Ross, D. J. (1970). Effects of storage on dehydrogenase activities of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2(1), 55-61. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(70\)90026-X](https://doi.org/10.1016/0038-0717(70)90026-X)
- Rossel, D., Maire, N., y Tarradellas, J. (1992). Dehydrogenase activity and biomass of soil microflora. En *International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology*. (pp. 17-21). Sigtuna, Suecia.: Dept. of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=SE19920109247>
- Saha, A., Bhaduri, D., Pipariya, A., Jain, N. K., y Basak, B. B. (2015). Behaviour of pendimethalin and oxyfluorfen in peanut field soil: effects on soil biological and biochemical activities. *Chemistry and Ecology*, 31(6), 550-566. <https://doi.org/10.1080/02757540.2015.1039526>
- Said-Pullicino, D., Gigliotti, G., y Vella, A. J. (2004). Environmental Fate of Triasulfuron in Soils Amended with Municipal Waste Compost. *Journal of Environment Quality*, 33(5), 1743. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.1743>
- Sakaliene, O., Papiernik, S. K., Koskinen, W. C., y Spokas, K. A. (2007). Sorption and predicted mobility of herbicides in Baltic soils. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 42(6), 641-647. <https://doi.org/10.1080/03601230701465601>
- Sánchez Gimeno, B., Sánchez Cabrero, B., y Varela González, J. (1987). *Microcosmos terrestre. Una técnica para la evaluación de los efectos producidos por los contaminantes*. Madrid: Centro de investigaciones energeticas, medioambientales y tecnologicas. Recuperado de https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/38/063/38063282.pdf
- Sannino, F., y Gianfreda, L. (2001). Pesticide influence on soil enzymatic activities. *Chemosphere*, 45(4-5), 417-425. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00045-5)

- Sawicka, A. (1996). Influence of imazethapyr and linuron on soil microorganisms under legume crops. En *Second International Weed Control Congress* (pp. 361-368). Copenhagen. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/331277155>
- Scarponi, L., Vischetti, C., y Buono, D. (2001). Imazamox in maize. Uptake-persistence and interference on protein and carbohydrate formation [*Zea mays* L.]. *Italian Journal of Food Science (Italy)*, 13(2), 213-219. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IT2002062259>
- Schaffer, A. (1993). Pesticide Effects on Enzyme Activities in the Soil Ecosystem. En J. M. Bollag y G. Stotzky (Eds.), *Soil biochemistry* (p. 418). M. Dekker. Recuperado de <http://bit.ly/2xr9PxW>
- Schnitzer, M. (1982). Organic Matter Characterization. En *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. (pp. 581-594).
- Schutter, M. E., y Dick, R. P. (2000). Comparison of Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Methods for Characterizing Microbial Communities. *Soil Science Society of America Journal*, 64(5), 1659. <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.6451659x>
- Schved, F., y Hassidov, B. (2010). Okara, a natural food ingredient for new product development of foodstuffs. *Agrofood industry in-tech*, 21(2), 46-47. Recuperado de <http://bit.ly/2XGeefb>
- Shaner, D. L. (2014). *Herbicide Handbook* (10^a edición). Lawrence, KS, USA: Weed Science Society of America.
- Shaner, D. L., y O'Connor, S. L. (1991). *The imidazolinone herbicides*. Recuperado de <http://bit.ly/2ROQMXL>
- Sheeba, Pratap Singh, V., Kumar Srivastava, P., y Mohan Prasad, S. (2011). Differential physiological and biochemical responses of two cyanobacteria *Nostoc muscorum* and *Phormidium foveolarum* against oxyfluorfen and UV-B radiation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(7), 1981-1993. <https://doi.org/10.1016/j.ECOENV.2011.07.006>
- Shukla, A. (1997). Effect of herbicides butachlor, fluchloralin, 2, 4-D and oxyfluorfen on microbial population and enzyme activities of rice field soil. *Indian Journal of Ecology*, 24(2), 289-192. Recuperado de <http://ashukla21.tripod.com/1997ije.pdf>

- Shukla, G., y Varma, A. (Ajit). (2011). *Soil enzymology*. Springer. Recuperado de <http://bit.ly/2NkveUj>
- Si, Y., Zhang, J., Wang, S., Zhang, L., y Zhou, D. (2006). Influence of organic amendment on the adsorption and leaching of ethametsulfuron-methyl in acidic soils in China. *Geoderma*, 130(1-2), 66-76.
<https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2005.01.009>
- Smith, J. L., Halvorson, J. J., y Papendick, R. I. (1993). Using Multiple-Variable Indicator Kriging for Evaluating Soil Quality. *Soil Science Society of America Journal*, 57(3), 743.
<https://doi.org/10.2136/sssaj1993.03615995005700030020x>
- Somasundaram, L., Racke, K. D., y Coats, R. (1987). *Effect of Manuring on the Persistence and Degradation of Soil Insecticides*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* (Vol. 39). <https://doi.org/10.1007/BF01698448>
- Souza, R. C., Cantão, M. E., Vasconcelos, A. T. R., Nogueira, M. A., y Hungria, M. (2013). Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. *Applied Soil Ecology*, 72, 49-61.
<https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2013.05.021>
- Stefanic, G., Eliade, G., y Chirnogeanu, I. (1984). Researches concerning a biological index of soil fertility. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=R08500112>
- Stokes, H. W., Holmes, A. J., Nield, B. S., Holley, M. P., Nevalainen, K. M., Mabbutt, B. C., y Gillings, M. R. (2001). Gene cassette PCR: sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. *Applied and environmental microbiology*, 67(11), 5240-5246. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5240-5246.2001>
- Soy2020, (2005). *Okara: Overview of Current Utilization*. Recuperado de <https://docplayer.net/42641429-Okara-overview-of-current-utilization-table-of-contents.html>
- Tabatabai, M. A. (1982). Soil enzymes. En A. Page, E. Miller, y D. Keeney (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties* (pp. 903-947). Madison, Wisconsin.: American Society of Agronomy.
- Tabatabai, M. A. (2003). Soil Enzymes. En *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
<https://doi.org/10.1002/0471263397.env211>

- Tabatabai, M. A., y Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(4), 301-307.
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1)
- Tejada, M., Gonzalez, J. L., García-Martínez, A. M., y Parrado, J. (2008). Effects of different green manures on soil biological properties and maize yield. *Bioresource Technology*, 99(6), 1758-1767.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2007.03.052>
- Tejada, M., García-Martínez, A. M., Gómez, I., y Parrado, J. (2010a). Application of MCPA herbicide on soils amended with biostimulants: Short-time effects on soil biological properties. *Chemosphere*, 80(9), 1088-1094.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.074>
- Tejada, M., Gómez, I., Hernández, T., y García, C. (2010b). Utilization of Vermicomposts in Soil Restoration: Effects on Soil Biological Properties. *Soil Science Society of America Journal*, 74(2), 525.
<https://doi.org/10.2136/sssaj2009.0260>
- Tejada, M., Benítez, C., Gómez, I., y Parrado, J. (2011a). Use of biostimulants on soil restoration: Effects on soil biochemical properties and microbial community. *Applied Soil Ecology*, 49(1), 11-17.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.07.009>
- Tejada, M., Gómez, I., y del Toro, M. (2011b). Use of organic amendments as a bioremediation strategy to reduce the bioavailability of chlorpyrifos insecticide in soils. Effects on soil biology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(7), 2075-2081. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2011.07.005>
- Tejada, M., García-Martínez, A. M., Rodríguez-Morgado, B., Carballo, M., García-Antras, D., Aragón, C., y Parrado, J. (2013). Obtaining biostimulant products for land application from the sewage sludge of small populations. *Ecological Engineering*, 50, 31-36. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2012.07.006>
- Tejada, M., Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., y Parrado, J. (2014). Degradation of chlorpyrifos using different biostimulants/biofertilizers: Effects on soil biochemical properties and microbial community. *Applied Soil Ecology*, 84, 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.07.007>

- Tejada, M., y Benítez, C. (2017). Flazasulfuron behavior in a soil amended with different organic wastes. *Applied Soil Ecology*, 117-118, 81-87.
<https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2017.05.009>
- Tejada, M., Morillo, E., Gómez, I., Madrid, F., y Undabeytia, T. (2017). Effect of controlled release formulations of diuron and alachlor herbicides on the biochemical activity of agricultural soils. *Journal of Hazardous Materials*, 322, 334-347. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.10.002>
- Tixier, C., Sancelme, M., Bonnemoy, F., Cuer, A., y Veschambre, H. (2001). Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: Synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(7), 1381-1389. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200701>
- Topp, E. (2003). Bacteria in agricultural soils: Diversity, role and future perspectives. *Canadian Journal of Soil Science*, 83(Special Issue), 303-309. <https://doi.org/10.4141/S01-065>
- Torsvik, V., Sørheim, R., y Goksøyr, J. (2002). Total bacterial diversity in soil and sediment communities—A review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 17(3-4), 170-178. <https://doi.org/10.1007/BF01574690>
- Trevors, J. T., Mayfield, C. I., y Inniss, W. E. (1982). Measurement of Electron Transport System (ETS) activity in soil. *Microbial Ecology*, 8(2), 163-168. <https://doi.org/10.1007/BF02010449>
- Ugolini, L., Cinti, S., Righetti, L., Stefan, A., Matteo, R., D'Avino, L., y Lazzeri, L. (2015). Production of an enzymatic protein hydrolyzate from defatted sunflower seed meal for potential application as a plant biostimulant. *Industrial Crops and Products*, 75, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.026>
- USDA. (2018). Food Composition Databases Show Foods -- Okara. Recuperado 30 de enero de 2019, de <http://bit.ly/2JfGGvu>
- Van Der Meer, J. R. (2006). Environmental pollution promotes selection of microbial degradation pathways. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4(1), 35-42. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2006\)004\[0035:EPPSOM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2006)004[0035:EPPSOM]2.0.CO;2)

- Vasic, V., Djuric, S., Jafari-Hajnal, T., Orlovic, S., Vasic, S., Poljakovic Pajnik, L., y Galović, V. (2019). The microbiological response of forest soils after application of nicosulfuron, imazamox and cycloxydim. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(5), 2305-2312.
<https://doi.org/10.1007/s13762-018-1862-0>
- Vasileva-Tonkova, E., Nustorova, M., y Gushterova, A. (2007). New Protein Hydrolysates from Collagen Wastes Used as Peptone for Bacterial Growth. *Current Microbiology*, 54(1), 54-57.
<https://doi.org/10.1007/s00284-006-0308-y>
- Vencill, W. K. (2002). Herbicide handbook. *Herbicide handbook*, (Ed. 8). Recuperado de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20023091367>
- Villanueva, A., Clemente, A., Bautista, J., Millán, F., y Millán, F. (1999a). Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-proteases. *Grasas y Aceites*, 50(6), 472-476.
<https://doi.org/10.3989/gya.1999.v50.i6.697>
- Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., y Millán, F. (1999b). Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(12), 1455-1460.
<https://doi.org/10.1007/s11746-999-0184-2>
- Vischetti, C., Casucci, C., y Perucci, P. (2002). Relationship between changes of soil microbial biomass content and imazamox and benfluralin degradation. *Biology and Fertility of Soils*, 35(1), 13-17.
<https://doi.org/10.1007/s00374-001-0433-5>
- Wagner, S., y Zablotowicz, R. (1997). Effect of organic amendments on the bioremediation of cyanazine and fluometuron in soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 32(1), 37-54.
<https://doi.org/10.1080/03601239709373075>
- Walker, W. W., Cripe, C. R., Pritchard, P. H., y Bourquin, A. W. (1988). Biological and abiotic degradation of xenobiotic compounds in invitro estaurine water and sediment/water systems. *Chemosphere*, 17(12), 2255-2270.
[https://doi.org/10.1016/0045-6535\(88\)90139-7](https://doi.org/10.1016/0045-6535(88)90139-7)

- Wang, H. L., Li, Y. Y., Wei, G. H., y Wang, X. D. (2007a). Imazaquin degradation and metabolism in a sandy loam soil amended with farm litters. *Journal of Environmental Sciences*, 19(9), 1108-1113.
[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60180-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60180-6)
- Wang, X., Liu, X., Wang, H., y Dong, Q. (2007b). Utilization and degradation of imazaquin by a naturally occurring isolate of *Arthrobacter crystallopoietes*. *Chemosphere*, 67(11), 2156-2162.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.12.042>
- Warkentin, B. P. (1995). The changing concept of soil quality. *Journal of Soil and Water*, 50(3), 226-228. Recuperado de
<http://www.jswnonline.org/content/50/3/226.extract>
- Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 237-241.
[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00205-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00205-6)
- Wauchope, R. D., y Koskinen, W. C. (1983). Adsorption-Desorption Equilibria of Herbicides in Soil: A Thermodynamic Perspective. *Weed Science*, 31(4), 504-512. <https://doi.org/10.1017/s0043174500069472>
- Winfree, R., Aguilar, R., Vázquez, D. P., LeBuhn, G., y Aizen, M. A. (2009). A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology*, 90(8), 2068-2076. <https://doi.org/10.1890/08-1245.1>
- Wu, X., Xu, J., Dong, F., Liu, X., y Zheng, Y. (2013). Simultaneous determination of metolachlor, pendimethalin and oxyfluorfen in bulb vegetables using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 5(22), 6389. <https://doi.org/10.1039/c3ay41332b>
- Yan, H., Wang, D., Dong, B., Tang, F., Wang, B., Fang, H., y Yu, Y. (2011). Dissipation of carbendazim and chloramphenicol alone and in combination and their effects on soil fungal:Bacterial ratios and soil enzyme activities. *Chemosphere*, 84(5), 634-641. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.038>
- Yang, Y., y Sheng, G. (2003). Enhanced Pesticide Sorption by Soils Containing Particulate Matter from Crop Residue Burns. *Environmental Science & Technology*, 37(16), 3635-3639. <https://doi.org/10.1021/es034006a>

- Yavari, S., Sapari, N. B., Malakahmad, A., y Yavari, S. (2019). Degradation of imazapic and imazapyr herbicides in the presence of optimized oil palm empty fruit bunch and rice husk biochars in soil. *Journal of Hazardous Materials*, 366, 636-642. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2018.12.022>
- Yeomans, J. C., y Bremner, J. M. (1988). A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 19(13), 1467-1476. <https://doi.org/10.1080/00103628809368027>
- Ying, G.-G., y Williams, B. (2000). Dissipation of herbicides in soil and grapes in a South Australian vineyard. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 78(3), 283-289. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00127-9](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00127-9)
- Yu, X. Y., Ying, G. G., y Kookana, R. S. (2009). Reduced plant uptake of pesticides with biochar additions to soil. *Chemosphere*, 76(5), 665-671. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2009.04.001>
- Yu, X., Pan, L., Ying, G., y Kookana, R. S. (2010). Enhanced and irreversible sorption of pesticide pyrimethanil by soil amended with biochars. *Journal of Environmental Sciences*, 22(4), 615-620. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60153-4](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60153-4)
- Zabaloy, M. C., Garland, J. L., y Gómez, M. A. (2008). An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied Soil Ecology*, 40(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2008.02.004>
- Zak, J. C., Willig, M. R., Moorhead, D. L., y Wildman, H. G. (1994). Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(9), 1101-1108. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90131-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90131-7)
- Zelles, L. (1999). *Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review*. *Biol Fertil Soils* (Vol. 29). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/s003740050533>
- Zelles, L., Bai, Q. Y., Beck, T., y Beese, F. (1992). Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(4), 317-323. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90191-Y](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90191-Y)

- Zhang, Z. P. (2003). Development of chemical weed control and integrated weed management in China. *Weed Biology and Management*, 3(4), 197-203. <https://doi.org/10.1046/j.1444-6162.2003.00105.x>
- Zhang, P., Sheng, G., Feng, Y., y Miller, D. M. (2005). Role of Wheat-Residue-Derived Char in the Biodegradation of Benzonitrile in Soil: Nutritional Stimulation versus Adsorptive Inhibition. *Environmental Science & Technology*, 39(14), 5442-5448. <https://doi.org/10.1021/es0480670>

