

La hidrólisis de diacetato de fluoresceína [3',6'-diacetilfluoresceína]: un método rápido y eficaz para determinar la actividad microbiana en muestras de suelo contaminado por pesticidas

Eustacio Ramírez-Fuentes* & Ma. Nieves Trujillo-Tapia**

Resumen

La hidrólisis de diacetato de fluoresceína [3',6'-diacetilfluoresceína]: un método rápido y eficaz para determinar la actividad microbiana en muestras de suelo contaminado por pesticidas. El uso inapropiado de pesticidas para la producción de alimentos agrícolas, ha provocado efectos negativos en la calidad del suelo, incluyendo la biomasa microbiana y su actividad. En la región costa de Oaxaca, el cultivo de papaya (*Carica papaya* L.) es altamente productivo y rentable; sin embargo, para su producción se emplea una gran diversidad de pesticidas, con la consecuente contaminación del suelo. El objetivo del trabajo fue medir la actividad microbiana en el suelo contaminado, utilizando el ensayo del diacetato de fluoresceína, por ser un método de análisis sencillo, rápido y eficaz. Se muestreó suelo de huertas de papaya del Arenal y Puerto Escondido con diferentes condiciones de producción y uso de pesticidas: i) Huerta nueva, plantas de un mes y sin pesticidas, ii) huerta joven, plantas de 10 meses con 30 aplicaciones de pesticidas, y iii) huerta vieja, plantas de 20 meses con más de 60 aplicaciones de pesticidas. El análisis de los resultados mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sitio y tipo de huerta. La concentración en la huerta Nueva fue de 0.802 mg de fluoresceína /g suelo seco /hr, y fue mayor en 2.03 y 2.06 veces con respecto a la huerta Joven y Vieja, respectivamente. Entre sitios fue mayor la concentración de fluoresceína en el Arenal (0.627 mg de fluoresceína /g suelo seco /hr) con respecto a Puerto Escondido (0.373 mg de fluoresceína /g suelo seco /hr). El efecto negativo del uso y aplicación de pesticidas se observó en la menor concentración de fluoresceína de la huerta Joven y Vieja. El empleo del

Abstract

Fluorescein diacetate Hydrolysis [3',6'-diacetilfluoresceína]: a fast and efficient method to determine microbial activity in soil samples contaminated by pesticides. The inappropriate use of pesticides for agricultural food production has caused negative effects on the quality of the soil, including microbial biomass and activity. On the coast of the Oaxacan region, the cultivation of papaya (*Carica papaya* L.) is highly productive and profitable; however, a wide variety of pesticides, with the consequent contamination of soil, is used for its production. The aim of the work was to measure the microbial activity in contaminated soil, using the test of diacetate fluorescein, as a simple, it is fast and effective method. It sampled soil from orchards of papaya of Arenal and Puerto Escondido with different conditions of production and uses of pesticides: i) new orchard, one month plants without pesticides, ii) young orchard, ten months with thirty applications of pesticides, and iii) old plants orchard, twenty months with more than sixty applications of pesticides. The analysis of the results showed significant differences ($p < 0.05$) between site and type of orchard. Concentration in the new orchard was 0.802 mg fluorescein /g dry soil /hr, and was higher at 2.03 and 2.06 times with respect to the young and old orchard. Between sites, the concentration of fluorescein was greater in the Arenal (0.627 mg fluorescein /g dry soil /hr) against Puerto Escondido (0.373 mg fluorescein /g dry soil /hr). The negative effect of the use and application of pesticides was observed in the lowest concentration of fluorescein of the Young and Old orchard. The use of the fluorescein diacetate

* Universidad del Mar, campus Puerto Ángel. Instituto de Recursos. Laboratorio de Biotecnología. Cd. Universitaria s/n, Pochutla, Oaxaca. CP 70902. correo electrónico: eustacio@angel.umar.mx

** Universidad del Mar, campus Puerto Ángel. Instituto de Ecología. Laboratorio de Biotecnología. Cd. Universitaria s/n, Pochutla, Oaxaca. CP 70902. correo electrónico: nieves@angel.umar.mx

método de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína es un buen indicador para tener un diagnóstico rápido y confiable de cambios en la actividad microbiana del suelo por efecto del uso de pesticidas.

Palabras clave: contaminación ambiental, papaya, producción agrícola, costa de Oaxaca.

hydrolysis method is a good indicator to have a fast and reliable diagnostic of changes in microbial activity in the soil due to the use of pesticides.

Key words: environmental contamination, agricultural production, Oaxaca coast, papaya.

El continuo crecimiento de la población humana [de 7 mil millones de personas en el 2009, aumentará a 9 mil millones para el 2050 según FAO (2009)], ha generado la necesidad de incrementar la producción agrícola para satisfacer la demanda alimentaria mundial; una forma de conseguir dicho incremento, es a través del uso y aplicación de fertilizantes químicos (para la nutrición de la planta) y plaguicidas (para el control de plagas y enfermedades). A nivel mundial, el 80% de los pesticidas se aplica en las actividades agrícolas, el 20% restante en casas, hoteles, restaurantes y jardines, entre otros (Science 2013). El uso de pesticidas a traído repercusiones negativas al ambiente y a la salud humana, tanto en países desarrollados y no desarrollados (Garnett *et al.* 2013). La exposición prolongada a altas dosis de pesticidas está asociada a enfermedades neuro-degenerativas (Mascarelli 2013). Para evaluar el impacto de los pesticidas sobre la salud humana y el ambiente, y en particular el riesgo de peligro en los suelos, se han empleado mediciones físicas y químicas; pero hoy en día, el monitoreo biológico está siendo cada vez más importante. Cada enfoque de medición tiene un objetivo, y proporciona información diferente: El análisis químico da una medida específica del contaminante (concentración); las técnicas geofísicas proporcionan información sobre los cambios en las características físicas del suelo; mientras que, el uso del enfoque biológico *in vivo* (monitoreo en las plantas superiores o en las lombrices de tierra) y modelos *in vitro* (células animales y bacterias) se utilizan como indicadores de contaminación del suelo (Colombo *et al.* 2013). El efecto de los pesticidas en la población microbiana del suelo es muy importante, ya que la mayoría de las funciones de los microorganismos son críticas en la producción de los cultivos, en la sustentabilidad del suelo y por consiguiente, en la calidad ambiental. Por lo

tanto, el conocer la estructura y la actividad de las comunidades microbianas, son indicadores para monitorear el grado de impacto que tienen los pesticidas en el ecosistema suelo y poder evaluar su estado biológico (Imfeld & Vuilleumier 2012). Dicho monitoreo puede llevarse a cabo por diversos métodos que estiman la actividad y la biomasa microbiana en el suelo, entre ellos se encuentran la fumigación-incubación (FI), y la fumigación-extracción (FE); ambos se basan principalmente en el uso del cloroformo para romper (lisar) las células microbianas liberando el contenido citoplasmático y posteriormente calcular la cantidad de nitrógeno y/o carbono orgánico liberado (Horwarth & Paul 1994, Ramírez-Fuentes *et al.* 2002a-b). Por otra parte, Anderson & Domsch (1985) propusieron el cociente metabólico (QCO₂), basado en la relación entre la respiración basal del suelo (producción de CO₂) y el carbono (C) de la biomasa microbiana como medida de la respuesta de los microorganismos ante una perturbación. Además, existe una amplia variedad de actividades enzimáticas como: Fosfatasa, β-glucosidasa, aril sulfatasa, nitrogenasa, entre otras; las cuales son sensibles a la contaminación por pesticidas y se han utilizado como indicadores de la salud del suelo (Giafrenda *et al.* 2005). También existe el uso de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (DAF), es un método ampliamente utilizado en estudios para evaluar cambios en la actividad microbiana del suelo provocados por el efecto de pesticidas y otros contaminantes (Adam & Duncan 2001). La técnica se basa en la hidrólisis del diacetato de fluoresceína por diferentes enzimas extracelulares: Proteasas, lipasas y esterasas; o unidas a membrana. El producto de la reacción enzimática es la fluoresceína (Fig. 1), la cual se puede observar en un microscopio para fluorescencia, o bien, puede ser medida utilizando un espectrofotómetro (Green *et al.* 2006). El objetivo del trabajo

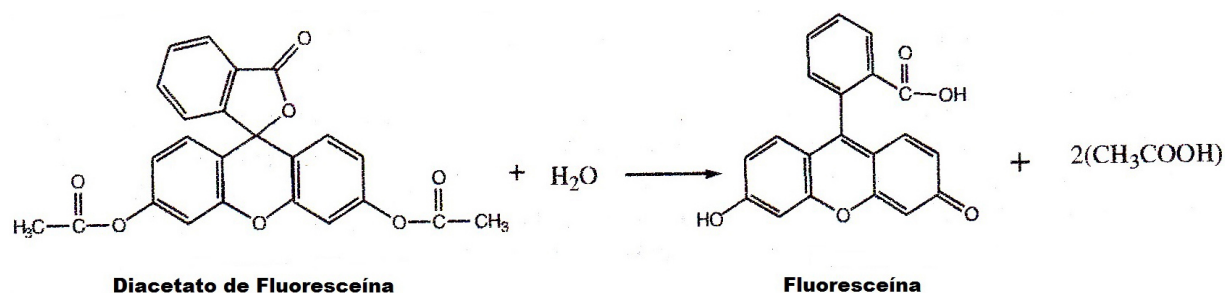


Figura 1. Ecuación de la reacción del diacetato de fluoresceína (Green 2006).

fue hacer un análisis, sencillo, rápido, eficaz y reproducible, utilizando la técnica de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína para tener un diagnóstico del efecto de los pesticidas en la actividad microbiana de suelos cultivados.

En el laboratorio de Biotecnología Ambiental de la UMAR, campus Puerto Ángel, se ha estado trabajando con diferentes cultivos agrícolas de la región costa de Oaxaca; uno de ellos es el cultivo de papaya (*Carica papaya* L.). En esta zona, el cultivo ocupa una superficie de 1,638 ha, y representa aproximadamente el 10% de la producción nacional (SIAP 2013). La papaya tiene diversos usos: Es un fruto con alto contenido en provitamina A y ácido ascórbico; además de consumirse como fruta fresca, en batidos, pastas y conservas. El fruto inmaduro se consume en muchos países como una verdura preparada de diferentes maneras. El látex de la papaya contiene papaína, enzima con aplicaciones en la industria de la alimentación, cosmética y farmacopea. En medicina popular se utiliza la papaya como digestivo, regula la función estomacal, es utilizado como laxante ligero, tiene efecto lubricante y estimula los movimientos peristálticos del intestino (Nor 2006, Ovando-Cruz *et al.* 2000). Para la producción de la papaya -desde el almacigo hasta la postcosecha- se utiliza una gran cantidad de fertilizantes (Tabla I) y pesticidas (herbicidas, insecticidas, acaricidas, nematocidas, bactericidas, entre otros) para el control de plagas y enfermedades (Tabla II) (Nor 2006). Hernández-Hernández *et al.* (2007), reportaron el uso de setenta diferentes productos químicos en huertas de papaya; y en promedio la concentración aplicada de ingrediente activo fue de 0.1 a 8.9 kg ha⁻¹/año. Las repercusiones en la comunidad microbiana debidas al uso inadecuado de

los pesticidas son la disminución de la actividad enzimática, así como, una menor cantidad de biomasa microbiana (Bishnu *et al.* 2012, Das *et al.* 2007, Tabatabai 1994).

Ante este panorama surge la pregunta: ¿Qué pasa con los microorganismos y su actividad en un suelo agrícola, que ha recibido pesticidas? En el presente estudio se analizó la actividad del DAF en suelo de huertas con papaya sometidos a diferentes tiempos de producción: i) Tres en Bajos del Arenal (Municipio de Santa María Huatulco, 15°50' latitud norte y 96°19' longitud oeste) y ii) tres en Puerto Escondido (Municipio de San Pedro Mixtepec, 15°55' latitud norte y 97°4' longitud oeste), ambos pertenecen a la región costa de Oaxaca. Predomina el tipo de suelo Regosol y Feozem (INEGI 2014). El primero está formado por material no consolidado, no presenta horizonte, son poco profundos y se encuentran formando playas. El segundo presenta una capa superficial oscura, suave, rica en materia orgánica y nutrientes

Tabla I. Requerimiento de nutrientes de acuerdo a la edad de la planta (PROCERCO 2006).

Nutrientes	2 a 6 meses (kg/ha)	6 a 12 meses (kg/ha)	1 a 2 años (kg/ha)	Total
N	20 - 40	40 - 60	60 - 120	120 - 220
P ₂ O ₅	30 - 60	80 - 120	140 - 180	250 - 360
K ₂ O	20 - 30	30 - 60	100 - 140	150 - 230
MgO	10 - 20	20 - 40	40 - 80	90 - 140
Zn	-	0 - 1	2 - 4	2 - 5
Cu	-	0.0 - 0.5	1 - 3	1.0 - 3.5
Mn	-	0 - 1	2 - 3	2 - 4
Fe	0 - 2	2 - 3	2 - 4	4 - 9
B	-	0 - 0.5	0.5 - 1.0	0.5 - 1.5

* Las fuentes de fertilización son: 17-17-17 (triple diecisiete), 18-46-00 (fosfato de amonio), nitrato de amonio, bayfolan forte, packard, foliar, cal y humiplex, entre otros.

Tabla II. Los productos químicos para un rol de aplicaciones para el control de plagas y enfermedades en una huerta comercial de papaya (PROCERCO 2006).

Nombre comercial	Ingrediente activo	Dosis recomendada (g/l de agua)	Frecuencia de aplicación (días)
Tecto 60	Tiabendazol 60%	1-2	8-15
Benlate	Benomilo 50%	1	8-15
Manzate	Mancozeb 80%	2-3	8-15
Captán	Captán 50%	2-3	8-15
Ridomil Gold Bravo 76.5 pH	Metalaxil M4.4% + Clorotalonil 72%	2-3	8-15
Terramicina Agrícola 5%	Oxitetraciclina 6.66%	2	8-15
Agrimycin 100	Estreptomina 18.75% + Oxitetraciclina 2.0 %	1	8-15
Agrimycin 500	Estreptomina 2.2% + Oxitetraciclina 0.235% + Sulfato Tribásico de cobre monohidratado 78.52%	2.5-3	8-15

* La aplicación del agroquímico se realiza utilizando 200 l de agua /ha.

(García-Mendoza *et al.* 2004). El criterio de selección fue la edad de la huerta: i) Nueva (N), para la huerta sin ninguna aplicación de pesticidas; ii) joven (J), para la huerta con 8 meses de producción, y con 30 aplicaciones de pesticidas (por lo menos); y, iii) vieja (V), para la huerta que había terminado de producir y tenía más de 60 aplicaciones de pesticidas. Para tomar la muestra de suelo, se siguió una trayectoria en zig-zag con intervalos de 10 m, en cada punto se tomó una sub-muestras de 150 g (aproximadamente) a una profundidad de 0-20 cm; de las sub-muestras se obtuvo una muestra compuesta de aproximadamente 5 kg, la muestra se colocó en bolsas de plástico previamente etiquetada y se llevaron al laboratorio para su acondicionamiento; éste consistió en el secado del suelo a temperatura ambiente, y su tamizado a través de una malla de 2 mm; se retiraron las piedras y restos vegetales de mayor tamaño (Foster 1995). Para el análisis del DAF se pesó 1g de cada muestra de suelo seco y pulverizado (utilizando un mortero), se colocaron en un tubo falcón de 50 ml, se adicionaron 50 ml de buffer de fosfatos 60 mM a pH 7.6 y se agitaron hasta obtener una muestra homogénea. Posteriormente se les adicionó 0.50 ml de la solución de DAF (20 mg DAF substrato @Sigma en 10 ml de acetona), se agitaron nuevamente y se colocaron en baño María a 37°C por 3 h, posteriormente, se les adicionó 2 ml de acetona (grado reactivo) para detener la hidrólisis de DAF, se transfirieron aproximadamente 30 ml de la solución en tubos de 50 ml y se centrifugaron a 8000 rpm por 5 min, en seguida se filtraron

utilizando papel Whatman #2; finalmente se pasaron a un tubo de espectrofotometría para medir la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro (Beckman Du 530). Las muestras de cada huerta y sitio se analizaron por triplicado junto con su respectivo blanco y curva de calibración. La curva estándar es lineal ($R^2= 0.982$; $y= 0.983x$) en el intervalo de 0.03 a 0.5 mg de fluoresceína y cubre la concentración de DAF en diferentes tipos de suelo (Green *et al.* 2006).

El análisis de varianza de dos vías indicó diferencias significativas ($p<0.05$): entre los sitios (Bajos del Arenal y Puerto Escondido) y los tipos de huerta (N, J y V), pero no en la interacción sitio-tipo de huerta. La concentración de DAF (Tabla III) en el suelo de Bajos del Arenal tuvo un valor promedio de 0.627 mg de fluoresceína /g suelo seco /hr y fue 1.6 veces mayor con respecto al promedio de Puerto Escondido de 0.373 mg de fluoresceína /g suelo seco /hr. Con relación a la concentración de DAF en el tipo de huerta, la N tuvo un valor promedio de 0.802 mg de fluoresceína /g suelo seco /hr y fue 2.03 y 2.06 veces mayor con respecto a la J y V (promedio de 0.394 y 0.304 mg de fluoresceína /g suelo seco /hr respectivamente). La concentración de DAF en la huerta N en el Arenal presentó un valor de 1.014 mg de fluoresceína /g suelo seco /hr y fue 1.7 veces mayor a la huerta N de Puerto Escondido. Los valores de la huerta J en el Arenal y Puerto Escondido fueron de 0.474 y 0.314 mg de fluoresceína /g suelo seco /hr respectivamente. Para el suelo de la huerta V en el Arenal, el valor fue de 0.392 y de 0.216 mg de fluoresceína /g suelo seco /hr para Puerto Escondido.

Las diferencias encontradas en la concentración de DAF en la huerta N con respecto a las huertas J y V, son debidas al efecto negativo provocado por el uso de fertilizante y de pesticidas en el suelo cultivado con papaya. Bishnu *et al.* (2012), encontraron que la concentración de DAF, el carbón de la biomasa microbiana, contenido de ergosterol y la β -glucosidasa, fueron menores cuando se les aplicó el herbicida ethión, en comparación con los tratamientos que no lo recibieron. El efecto negativo del ethión, de acuerdo a los autores, es debido a una reducción en la biomasa microbiana o a la inhibición de las enzimas asociadas a las células microbianas. En otros trabajos, han reportado resultados similares con el uso de pesticidas, por ejemplo, Surya *et al.* (2010), encontraron una disminución de la actividad nitrogenasa (8 veces) cuando se aplicó el herbicida endosulfan. Floch *et al.* (2011), determinaron a través de diferentes actividades enzimáticas, que las comunidades microbianas del suelo se vieron afectadas negativamente entre un 15 a 45 % cuando aplicaron pesticidas (2,4D, atrazina, carbamil, diurón, entre otros) al suelo. El uso de fertilizantes químicos es una práctica generalizada en la agricultura, aporta los principales nutrientes al suelo: N, P y K; sin embargo, puede tener efectos no deseables en la microflora del suelo. Haiyan *et al.* (2007), informaron que la aplicación desbalanceada de fertilizantes químicos en el suelo, afectó la biomasa microbiana y su actividad, causada por la toxicidad directa del fertilizante o bien, por la acidificación del pH provocada por fertilizantes nitrogenados.

Las diferencias encontradas en la concentración de DAF en el suelo contaminado de las huertas de papaya del Arenal y Puerto Escondido, pueden ser debidas a factores como: Contenido de materia orgánica, tamaño de partícula (textura) y pH (Green *et al.* 2006). Das *et al.* (2007), evaluaron el efecto del herbicida novaluron en la actividad microbiana por medio del método de DAF en dos tipos de suelo: i) Aluvial arcillolimoso, y ii) salino; observaron una menor actividad microbiana en el suelo salino, provocada por la concentración de sales más el herbicida.

Por lo anterior, se requiere llevar a cabo la caracterización físico-química y biológica del suelo, para relacionar dichas características con

Tabla III. Actividad hidrolítica del diacetato de fluoresceína (FDA) en muestras de suelo contaminado con pesticidas (mg de fluoresceína /g de suelo seco / hr).

Sitio	Huerta			
	Nueva	Joven	Vieja	
Arenal	1.014	0.474	0.392	0.627 ^a
Puerto Escondido	0.589	0.314	0.216	0.373 ^a
	0.802 ^b	0.394 ^b	0.304 ^b	

a: Promedio por sitio b: Promedio por tipo de huerta

el efecto de los pesticidas en la comunidad microbiana y su actividad. De igual manera, son necesarios trabajos de investigación para identificar, cuantificar y estudiar el comportamiento de los pesticidas en el suelo de las huertas de papaya: Su concentración, toxicidad, persistencia, movilidad (Andreu & Picó 2004); así como, su potencial a ser degradados por procesos químicos y microbiológicos (biodegradación) (Alexander 1994).

Con base en los resultados mostrados, se puede concluir que, el uso del método de DAF es un buen indicador para hacer un diagnóstico rápido y confiable de muestras de suelo contaminados. Por otro lado, el suelo cultivado con papaya en la región costa de Oaxaca, presenta problemas de contaminación debido al uso inadecuado y constante de fertilizantes químicos y pesticidas, como se demostró por la prueba de DAF en la actividad microbiana del suelo estudiado.

Agradecimientos

A la Fundación PRODUCE, Oaxaca, por el apoyo al proyecto 2IE1104. A los productores que amablemente permitieron la toma de muestra de suelo de su parcela. A los revisores, por sus pertinentes comentarios, los cuales ayudaron a mejorar el escrito.

Referencias

- Adam, G. & H. Duncan. 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (DAF) in a range of soils. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 943-951.
- Alexander, M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. 2^a ed., Academic Press, 453 pp.
- Anderson, T.H. & K.H. Domsch. 1985. Maintenance carbon requirements of actively metabolizing microbial populations under in situ situations. *Soil Biology & Biochemistry* 17: 197-203.

- Andreu, V. & Y. Picó. 2004. Determination of pesticides and their degradation products of soil: critical review and comparison of methods. *Trends in Analytical Chemistry* 23(10-11): 772-788.
- Anónimo. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática <http://gaia.inegi.org.mx/mdm5/viewer.html> consultada 22/01/14
- Anónimo. Organización para la Alimentación y la Agricultura. 2009. La agricultura en la perspectiva del año 2050. Foro de Expertos de Alto Nivel: Cómo alimentar al mundo. Roma 12-13 Octubre.
- Bishnu, A., A. Chakraborty, K. Chakrabarti & S. Tapan. 2012. Ethion degradation and its correlation with microbial and biochemical parameters of tea soils. *Biol Fertil Soils* 48: 19-29.
- Colombo, A., G. Amodei, S. Cantù, F. Teoldi, F. Cambria, G. Rotella, F. Natolino, M. Lodi, E. Benfenati & D. Baderna. 2013. Chemical-based risk assessment and in vitro models of human health effects induced by organic pollutants in soils from the Olona Valley. *Science of the Total Environment* 463-464: 790-801.
- Das, P., P. Raktim & C. Ashim. 2007. Effect of novaluron on microbial biomass, respiration, and fluorescein diacetate-hydrolyzing activity in tropical soils. *Biol Fertil Soils* 44: 387-391.
- Floch, C., A.C. Chevremont, K. Joanico, Y. Capowicz & S. Criquet. 2011. Indicators of pesticides contamination: Soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via BioEcoplates. *European Journal of Soil Biology* 47: 256-263.
- García-Mendoza, A.J., M. de Jesús-Ordoñez & M. Briones-Salas (eds.). 2004. Biodiversidad de Oaxaca. Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza, Universidad Nacional Autónoma de México, World Wildlife Fund. México. 603 pp.
- Foster, J. C. 1995. Soil sampling, handling, storage and analysis. Pp: 49-51 *In*: Kassem, A. & P. Nannipieri (eds.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. San Diego, California.
- Giafrenda, L., M.A. Rao, A. Piotrowska, G. Palumbo & C. Colombo. 2005. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. *Science of Total Environment* 341: 265-279.
- Green, V.S., D.E. Stott & M. Diack. 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 693-701.
- Garnett, T., M.C. Appleby, A. Balmford, I.J. Bateman, T.G. Benton, P. Bloomer, B. Burlingame, M. Dawkins, L. Dolan, M. Herrero, I. Hoffmann, P. Smith, P.K. Thornton, C. Toulmin, S.J. Vermeulen & H.C.J. Godfray. 2013. Sustainable Intensification in Agriculture: Premises and Policies. *Science* 341: 33-34.
- Haiyan, C., L. Xiangui, F. Takeshi, M. Sho, Y. Kazuyuki, H. Junli & Z. Jiabao. 2007. Soil microbial biomass, deshydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 2971-2976.
- Hernández-Hernández, C.N.A., J. Valle-Mora, A. Santiesteban-Hernández & R. Bello-Mendoza. 2007. Comparative ecological risks of pesticides used in plantation production of papaya: Application of the SYNOPSIS indicator. *Science of the Total Environment* 381: 112-125.
- Horwarth, W.R. & E.A. Paul. 1994. Microbial Biomass. Pp: 753-773 *In*: Weaver R. W., Angle J. S. y Bottomley P. S. (eds.), *Methods of Soil Analysis: Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin.
- Imfeld, G. & S. Vuilleumier. 2012. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. *European Journal of Soil Biology* 49: 22-30.
- Mascarelli, A. 2013. Growing up with pesticides. *Science* 341: 740-741.
- Nor, L.F. 2006. Diagnóstico de la papaya maradol. Promotora de Servicios Comerciales del Estado de Campeche. Campeche, México, 34 pp.
- Ovando-Cruz, M.E., V. Serrano-Altamirano & M. Vázquez-Martínez. 2000. Manual para producir papaya maradol en la costa de Oaxaca. Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria, México, 66 pp.
- Ramírez-Fuentes, E., C. Lucho-Constantino, E. Escamilla-Silva & L. Dendooven. 2002a. Characteristics and carbon and nitrogen dynamics in soil irrigated with wastewater for different lengths of time. *Bioresource Technology* 85: 179-187.
- Ramírez-Fuentes, E., M.L. Luna-Guido, E. Van den Brock & L. Dendooven. 2002b. Incorporation of glucose-14C and NH₄⁺ in microbial biomass of alkaline saline soil. *Biol Fertil Soils* 36: 269-275.
- Science. 2013. Smart Pest Control. Consultada el 03 de septiembre del 2013: www.sciencemag.org. 341: 730-731.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultada el 06 de septiembre del 2013: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350
- Surya, K.S., S. Jitender, D. Prem & S.L. Surender. 2010. Influence of Endosulfan on Microbial Biomass and Soil Enzymatic Activities of a Tropical Alfisol. *Bull Environ Contam Toxicol* 84: 351-356.
- Tabatabai, M.A. 1994. Soil Enzymes. Pp: 775-833 *In*: Weaver R. W., Angle J. S. & Bottomley P.S. (eds), *Methods of Soil Analysis: Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin.

Recibido: 11 de septiembre de 2013

Aceptado: 1 de abril de 2014