

GRUPOS BACTERIANOS EN UN ARGIUJOL TÍPICO CON APLICACIÓN DE GLIFOSATO: INFLUENCIA EN BACTERIAS DEL NITRÓGENO

MÓNICA FABIOLA BOCCOLINI*¹; SOFÍA MOYANO¹; MARIANA BONETTO¹;
TOMÁS BAIGORRIA¹; CRISTIAN CAZORLA¹

Recibido: 6/7/2018

Recibido con revisiones: 23/5/2019

Aceptado: 25/5/2019

RESUMEN

Los microorganismos de suelo son los responsables de numerosas funciones y pueden actuar como “marcador biológico”, reflejando rápidamente los efectos negativos de los plaguicidas que son comúnmente usados. Este estudio evalúa el efecto de dos dosis de glifosato sobre la actividad microbiana y C de la biomasa microbiana del suelo, abundancia de grupos bacterianos y la estructura de la comunidad de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) en un suelo Argiudol típico. Se realizó un bioensayo con suelo agrícola de Marcos Juárez, Córdoba. Los tratamientos fueron suelo sin glifosato (control), y con 3,1 (dosis a campo) y 31 mg ia.kg⁻¹ suelo (dosis exceso). A los 3, 7, 14 y 21 días de la aplicación se realizó recuento de bacterias heterótrofas, celulolíticas, fijadoras de N y nitrificantes, y se determinó la respiración microbiana (RM); C de la biomasa microbiana (C-BM) y la actividad enzimática por hidrólisis del diacetato fluoresceína. Además se determinó la diversidad genética de las BOA mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturante. Las bacterias del ciclo del N mostraron incrementos en la abundancia con ambas dosis; mientras que las del C no fueron afectadas y al igual que la RM estuvieron condicionadas por los días transcurridos; mientras que el C-BM no cambió debido probablemente al contenido de materia orgánica del suelo (MOS). La actividad enzimática disminuyó con la mayor dosis del herbicida al día 14. La diversidad de BOA fue mayor con la dosis a campo a los 7 días. Bajo las condiciones estudiadas, las bacterias del ciclo del N y la actividad enzimática mostraron mayor sensibilidad al glifosato que el resto de los bioindicadores. Este estudio suma evidencias de que el efecto del glifosato sobre la microbiota del suelo es variable y está condicionado por factores edáficos principalmente por la MOS y dosis utilizadas.

Palabras clave: Bioindicadores; Electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE); Herbicida

BACTERIAL GROUPS IN A TYPICAL ARGIUJOL WITH APPLICATION OF GLYPHOSATE: INFLUENCE ON BACTERIA OF NITROGEN

ABSTRACT

Soil microorganisms are responsible for many functions and could be considered “biological markers” as these quickly reflect the negative effects of pesticides that are commonly used. This study evaluates the effect of two doses of glyphosate on soil microbial activity and carbon from microbial biomass, on the abundance of bacterial groups, and structure of the community of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in a typical Argiudoll. A bioassay was carried out with the agricultural soil from Marcos Juárez, Córdoba. The treatments were: soil without glyphosate (control); soil with application of 3,1 mg ai kg⁻¹ (field dose) and another of 31 mg ai kg⁻¹ (excess dose). At 3, 7, 14 and 21 days after the glyphosate application, the heterotrophic, cellulolytic, N-fixing and, nitrifying bacteria were counted, and microbial respiration (MR); carbon from microbial biomass (C-MB) and the enzymatic activity by fluorescein diacetate hydrolysis were determined. In addition, the genetic diversity of the AOB was determined by denaturing gradient gel electrophoresis. Bacteria related to the N cycle showed increases in the abundance with both doses of glyphosate, while the bacteria related to the C cycle did not show significant differences and, like MR, were conditioned by the incubation days. While the C-MB did not show differences probably due to the soil organic matter content (SOM). The enzymatic activity decreased with the highest dose of the herbicide, at 14 days. The diversity of AOB was greater at field dose and after 7 days. Under evaluated conditions, N cycle bacteria and its enzymatic activity showed greater sensitivity to glyphosate than other bioindicators. This study adds evidence to the glyphosate effects on soil microbiota which are variable and depend on edaphic factors, mainly SOM and the used doses.

Keywords: Bioindicators; Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); Herbicide

¹ INTA Marcos Juárez

² Autor de contacto: boccolini.monica@inta.gov.ar

INTRODUCCIÓN

La Argentina es el décimo país agrícola en el mundo, con 31 millones de hectáreas dedicadas a la agricultura. El 74% de la superficie agrícola es ocupada por los cultivos transgénicos (soja, maíz y algodón) y en el 78,5% de la misma se realiza siembra directa (Aparicio *et al.*, 2013). Estas tecnologías conllevan al uso de productos químicos durante los períodos de barbecho, lo cual sitúa al glifosato como el herbicida más comúnmente utilizado en el país (Aparicio *et al.*, 2013). Según un informe del mercado argentino de fitosanitarios (CASAFE, 2012), el glifosato sufrió un incremento del 24% en facturación en 2012 con respecto al 2011.

Los microorganismos de suelo son los responsables de numerosas funciones incluyendo el ciclo de los nutrientes, la formación de agregados de suelo y el ciclado de la materia orgánica (MO); es así que, los impactos sobre la comunidad microbiana podrían afectar la fertilidad del suelo y la producción de los cultivos (Nguyen *et al.*, 2016). Debido a una respuesta rápida, los microorganismos pueden actuar como “un marcador biológico”, reflejando los efectos negativos de los plaguicidas que son comúnmente usados (Filip, 2002).

Los parámetros bioindicadores de suelo más utilizados en estudios con aplicación de glifosato y otros plaguicidas son la respiración microbiana (RM) y C de la biomasa microbiana (C-BM), coeficiente metabólico (qCO_2), actividad enzimática global y específica, así como también, indicadores basados en técnicas moleculares, como la diversidad genética de bacterias totales y de grupos funcionales bacterianos como los del ciclo del N (Araújo *et al.*, 2003; Zabaloy *et al.*, 2008, 2012, 2016; Angelini *et al.*, 2013; Panettieri *et al.*, 2013; Nakatani *et al.*, 2014; Mukherjee *et al.*, 2016).

En particular, Zabaloy *et al.* (2016) reportaron a la comunidad de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) como biomarcadores de toxicidad potencial de glifosato. También Angelini *et al.* (2013) y Frioni, (2006) reportan una respuesta de sensibilidad en bacterias nitrificantes y fijadoras de N al aplicar glifosato y otros herbicidas en el suelo.

Numerosas investigaciones han reportado efectos diversos y contradictorios del glifosato sobre las comunidades microbianas en los agroecosistemas. Esto es debido a que, si bien el glifosato puede interferir en la síntesis de algunos compuestos que intervienen en el crecimiento microbiano (Nguyen *et al.*, 2016) afectando procesos biológicos y miembros de la comunidad (Zabaloy *et al.*, 2008), también se ha observado que podría actuar como fuente de C, N y P para diversos microorganismos (Van Eerd *et al.*, 2000; Gomez *et al.*, 2009; Mijangos *et al.*, 2009; Panettieri *et al.*, 2013).

La degradación microbiana es considerada el principal proceso que determina la persistencia de los plaguicidas en el suelo (Kogan & Alister, 2013; Aparicio *et al.*, 2015). El glifosato es una molécula fuertemente quelante y su capacidad de adsorción a la matriz del suelo hace que se acumule y sea muy persistente afectando su degradación. En el medio ambiente presenta una vida media de 4 a 180 días (revisado por Aparicio *et al.*, 2015). La persistencia depende entre otros factores, del contenido de MO, textura, mineralogía y pH del suelo (Kogan & Alister, 2013; Okada *et al.*, 2016). Así, cada tipo de suelo tendría una tasa variable de descomposición; de grado de adsorción a las partículas del suelo y de toxicidad de glifosato o sus metabolitos para las poblaciones microbianas susceptibles (Newman *et al.*, 2016).

Si bien existen trabajos sobre los efectos del glifosato en la microbiota de suelos Molisoles de la región pampeana Argentina (Zabaloy *et al.*, 2008, 2012, 2016; Gomez *et al.*, 2009; Rörig, 2012; Allegrini *et al.*, 2015; Guijarro *et al.*, 2018), hasta donde alcanza nuestro conocimiento, existe poca información sobre los efectos de dosis crecientes del herbicida en un Argiudol típico. Además no se han reportado trabajos que caractericen la diversidad genética y estructura de las comunidades microbianas sensibles a la aplicación de glifosato como las BOA en este tipo de suelo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de dos dosis de glifosato (utilizada a campo y en exceso) sobre la actividad y C de la biomasa microbiana del suelo, abundancia de grupos funcionales bacterianos de los

ciclos del C y N; y la estructura de la comunidad de BOA en un suelo Argiudol típico bajo condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del suelo y preparación de los microcosmos

Se realizó un bioensayo con suelo proveniente de un lote de historial agrícola con aplicación del herbicida en la estación experimental agropecuaria INTA Marcos Juárez (Córdoba). El suelo está clasificado como Argiudol típico perteneciente a la serie Marcos Juárez, con capacidad de uso I (INTA, 1978). La serie presenta un horizonte A (0-19 cm de profundidad) con características propias de un suelo franco-limoso (25% arcilla, 69% limo y 6% arena). El contenido de materia orgánica (MO) es de 3,26%; nitrógeno (N) total 0,18% y 36 ppm de fósforo (P Bray). El pH es de 6,4; la CIC 19,3 cmol_c. Kg⁻¹ y la saturación de bases es del 91% (INTA, 1978). De acuerdo al contenido de MO, se lo puede clasificar dentro de los suelos con contenido medio (2 a 4%) (Conti, 2000).

Se extrajo suelo de 0-10 cm de profundidad con pala y se almacenó a 4 °C hasta su procesamiento. En el laboratorio se dejó a temperatura ambiente durante 24 h y se tamizó por 4 mm. Los microcosmos fueron preparados con 200 g de suelo que se colocaron en bandejas plásticas. Un total de 36 bandejas fueron utilizadas (3 dosis de herbicida x 4 tiempos de muestreo x 3 repeticiones), las que luego se pre incubaron a 25°C durante 48 h.

Se utilizó glifosato de formulación comercial (74,7%) de base seca de ingrediente activo (ia) Roundup Ultramax de Monsanto para la preparación de las dosis, las que se ajustaron de acuerdo al tamaño de la bandeja y al peso de suelo utilizado considerando su densidad de 1,2 toneladas por hectárea (10 cm de profundidad). Las aplicaciones se realizaron con dispersor. Los tratamientos evaluados fueron: a) Suelo sin agregado de glifosato (control), b) Suelo con dosis de glifosato recomendada a campo de 1,5 kg de producto por hectárea (3,1 mg ia.kg⁻¹ suelo (s)) y c) Suelo con una dosis de glifosato 10 veces ma-

yor a la recomendada de 15 kg de producto por hectárea (31 mg ia.kg⁻¹ s) para simular una concentración potencial diferente al uso convencional del herbicida en la zona (Zabaloy *et al.*, 2008). Las bandejas con los tratamientos de aplicación de glifosato y con el tratamiento control (a las que se le adiciono sólo agua destilada) fueron incubadas en condiciones controladas de temperatura (25°C) y humedad (75% de capacidad de campo). La humedad se mantuvo con riego en forma periódica con agua destilada teniendo en cuenta el peso de la bandeja. Los muestreos fueron destructivos y se realizaron a los 3, 7, 14 y 21 días de realizadas las aplicaciones.

Determinaciones microbiológicas

Abundancia de grupos funcionales bacterianos

En todos los casos para el recuento bacteriano se realizaron diluciones decimales seriadas de 1 en 10 utilizando solución salina o fisiológica (0,9% NaCl) como diluyente a partir de 1 g de suelo.

La abundancia de bacterias heterótrofas aerobias totales se estimó a través de la técnica de recuento de viables en placa en medio agar triplicasa soya (ATS) (Frioni, 2006). Se sembraron 0,1 mL de las diluciones 10⁻² hasta 10⁻⁵ por duplicado en cada placa con 25 mL de medio. Posteriormente se incubaron a 28 °C durante 48 h. Para fijadoras de N de vida libre se utilizó recuento en placa con medio sólido selectivo libre de N y C como fuente de energía de acuerdo con Frioni (2006). Se sembraron 0,1 mL de las diluciones 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴ por duplicado en cada placa con 25 mL de medio y posteriormente se incubaron a 28 °C durante 72 h. En ambos casos se contaron aquellas placas cuyas diluciones contenían entre 30 y 300 colonias y el número de bacterias fue expresado como log₁₀ UFC (Unidades formadoras de colonias) g⁻¹ de suelo.

Para las bacterias nitrificantes y celulolíticas se utilizó la técnica del Número más probable (NMP) (Alexander, 1965). En nitrificantes se utilizó medio líquido selectivo con (NH₄)₂SO₄ y CaCO₃ según Frioni (2006). Las diluciones fueron sembradas por triplicado (1 mL) en tubos que contenían 1,5 mL de medio, luego se incubaron a 28 °C durante 28 días. La lectura se realizó

con la adición de 10 gotas de H_2SO_4 concentrado y 10 gotas de difenilamina sulfúrica detectándose cambio de color a azul. En celulíticos se utilizó medio líquido selectivo al que se le adicionaron tiras de papel de filtro semi sumergidas en el medio (Frioni, 2006). Se sembró 1 mL de las diluciones por triplicado en tubos con 9 mL de medio y posteriormente se incubaron a 28 °C durante 15 días. La lectura se realizó observando cambio de color en el papel, lo que se consideró un resultado positivo (degradación). Los resultados fueron expresados como \log_{10} del número de bacterias g^{-1} de suelo.

Actividades microbianas del suelo

La actividad enzimática general del suelo se determinó a partir de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (DAF) propuesta por Schnurer & Rosswall, (1982) y descrita por Alef (1995). A 1 g de suelo en 15 mL de *buffer* fosfato sodio (60 mM, pH 7,6) se le adicionó 10 mL de solución sustrato DAF (4,8 mM en acetona), se agitó durante 2 h a 20 °C. Posteriormente se filtró la suspensión y se midió el filtrado a 490 nm con espectrofotómetro. La actividad hidrolítica fue expresada como μg fluoresceína $h^{-1} g^{-1}$ de suelo seco (ss).

La respiración microbiana de suelo (RMS) fue determinada por la liberación de CO_2 a partir 30 g de suelo en frascos herméticamente cerrados a 25 °C durante 7 días en oscuridad (Jenkinson & Powlson, 1976). El CO_2 fue capturado con NaOH (0,2 N) y titulado con H_2SO_4 (0,1N) en presencia de $BaCl_2$ al 20% y fenolftaldeína. La concentración de C liberado fue expresada como μg C- CO_2 $d^{-1} g^{-1}$ ss.

Contenido de C de la biomasa microbiana

El C de la biomasa microbiana (C-BM) fue medido por el método de fumigación-extracción (Vance *et al.*, 1987). Al suelo seco (7,5 g) se le agregaron 2,5 mL de agua destilada en un tubo de 50 mL y se incubó en forma no hermética durante 15 h a 30°C en oscuridad. Luego se fumigó con 0,4 mL de cloroformo durante 30 min tapando herméticamente. Los blancos (no fumigados) fueron incubados bajo las mismas condiciones que los fumigados. Posteriormente se agregaron 30 mL de solución extractante (0,5 mol/L K_2SO_4),

agitando 1 h, se centrifugó y filtró. Luego se extrajeron 4 mL del extracto y se le adicionaron 1 mL de 0,0667 M de $K_2Cr_2O_7$ y 4 mL de H_2SO_4 concentrado. Finalmente se realizó la digestión a 140°C durante 30 min y se midió la absorbancia a 590 nm con espectrofotómetro. El C extraído fue expresado como μg C g^{-1} suelo seco.

El cociente metabólico (qCO_2) fue obtenido como la proporción de C- CO_2 de la muestra de suelo liberado durante 7 días por unidad de biomasa microbiana (Anderson & Domsch, 1993). Los resultados fueron expresados como μg C- CO_2 $d^{-1} \mu g^{-1}$ de C-BM.

Diversidad y estructura de la comunidad de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA)

A partir de 0,5 g de suelo se realizó la extracción de ADN con kit Fast DNA Spin para suelos (MP Biomedicals). La calidad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en agarosa al 1% y la concentración se midió a 260 nm con nano espectrofotómetro. Para la amplificación de los genes 16S ARNr de las BOA se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada o *Nested* PCR. En la primera amplificación se utilizaron los cebadores específicos CTO F189 y R654 (Kowalchuk *et al.*, 1997) que flanquean una región de 465 bp ubicada entre los dominios variables V2 y V3 del ADN/ARNr 16S. El producto generado fue utilizado como molde para la segunda amplificación con los cebadores universales F341-GC y R534 (Muyzer *et al.*, 1993) que amplifican un fragmento de aproximadamente 233 bp del dominio V3 ADN/ARNr 16S.

La primera reacción de PCR (25 μL volumen final) se realizó con *buffer* Taq polimerasa 1X (Promega) más 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 μM de cada cebador, 1,5 U de enzima Go Taq (Promega), 5% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,2 mM de dNTPs (Promega), 0,2 $\mu g/\mu L$ albumina sérica bovina (BSA) (Fermentas), 80 ng de ADN y agua destilada estéril. En la segunda reacción (40 μL volumen final) se utilizó *buffer* Taq polimerasa 1X (Promega) más 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,1 μM de cada cebador, 1 U de enzima Go Taq (Promega), 5% (v/v) dimetilsulfóxido (DMSO), 0,2 mM de dNTPs (Promega), 0,2 $\mu g/\mu L$ albumina sérica bovina (BSA) (Fermentas) y se agregó 1,5

μL de producto de PCR de la primera reacción. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C , seguida de 35 ciclos de 30 seg de desnaturalización a 94°C , 45 seg de *annealing* a 55°C y 45 seg de extensión a 72°C , con un paso de extensión final de 10 min a 72°C .

Todos los productos PCR fueron chequeados en agarosa al 1% para verificar su tamaño y calidad. Posteriormente, los amplicones fueron separados por electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante o *DGGE*. El gel se preparó con poliacrilamida al 8% con un gradiente lineal desnaturalizante de 35 a 65% (donde el 100% de desnaturalizante contiene urea 7M y formamida 40% (v/v)). Luego se sembraron $38 \mu\text{L}$ de los productos de PCR por calle. Las condiciones de electroforesis fueron a 60 V durante 16 h a 60°C . El gel fue teñido con GelRed en TAE 1X (0,04 M Tris; 0,02 M Acetato de sodio; 1mM EDTA; pH=7.4) durante 30 min y visualizado bajo luz UV. Los perfiles *DGGE* fueron digitalizados y analizados con el software Gel Compare II (2005). La posición y la intensidad de las bandas fueron utilizadas para el cálculo de diversidad de las muestras mediante el índice de Shannon-Weaver (H') y análisis de conglomerados (AC) para observar la similitud entre los perfiles moleculares.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2017). Se aplicó modelo lineal mixto tomando como efectos fijos los tratamientos (dosis) del herbicida y las fechas (días de incubación transcurridos desde las aplicaciones). Para la diferencia entre medias se utilizaron test de comparación LSD Fisher y DGC con un nivel de significancia menor o igual al 5%.

RESULTADOS

Efectos del glifosato sobre la abundancia de los grupos funcionales bacterianos

Los tratamientos con glifosato cuyas dosis fueron de 3,1 y 31 mg ia.kg^{-1} s provocaron un incremento significativo ($P \leq 0,05$) en el número de bacterias fijadoras de N respecto al control a los 7 y 14 días (**Figura 1a**). En las nitrificantes, el tratamiento de mayor dosis 31 mg ia.kg^{-1} s aumentó significativamente ($P \leq 0,05$) la abundancia a los 3 y 14 días. En esta última fecha, la dosis recomendada a campo de $3,1 \text{ mg ia.kg}^{-1}$ s también superó al control (**Figura 1b**).

El análisis de abundancia de las bacterias heterótrofas aerobias y celulolíticas muestra que la aplicación de glifosato no afectó a dicha variable, pero si existieron cambios significativos en la

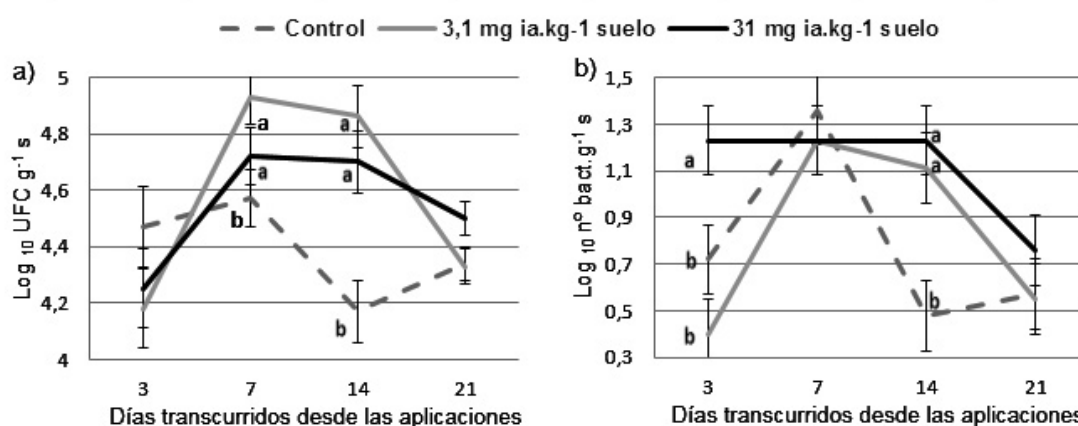


Figura 1. Valores promedio de abundancia de bacterias fijadoras de N (\log_{10} UFC g^{-1} de suelo) (a) y de nitrificantes (\log_{10} del número de bacterias g^{-1} de suelo) (b) según los tratamientos (dosis) y días transcurridos desde las aplicaciones. Las barras indican el error estándar ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) según LSD de Fisher.

Figure 1. Average values of the abundance of N fixing bacteria (\log_{10} UFC g^{-1} soil) (a) and nitrifying bacteria (\log_{10} of the number of the bacteria g^{-1} soil) (b) according to the treatments (doses) and days after application. The bars indicate the standard error ($n = 3$). The different letters indicate significant differences ($P \leq 0.05$) according to Fisher's LSD.

misma ($P \leq 0,05$) con los días transcurridos en el experimento o incubación (**Tabla 1**). El número de ambos grupos aumentó hasta el día 14, fecha a partir de la cual, la abundancia se mantuvo en las heterótrofas hasta el día 21; mientras que, en las celulolíticas disminuyó.

Efectos del glifosato sobre la actividad microbiana, coeficiente metabólico y C de la biomasa microbiana

La hidrólisis del DAF presentó un comportamiento fluctuante similar con los tres tratamientos evaluados, a excepción de la fecha 14 donde se observa una disminución significativa ($P \leq 0,05$) del 53% con la aplicación de la mayor dosis de 31 mg ia.kg⁻¹s de glifosato respecto al control (**Figura 2**). Por el contrario, los valores de respiración microbiana del suelo (RMS) y coeficiente metabólico (qCO₂) no revelaron efecto del herbicida, registrándose en ambos, un aumento significativo con los días transcurridos ($P \leq 0,05$) alcanzando un máximo al día 14 (**Tabla 1**). En el C de la biomasa microbiana (C-BM) no se hallaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre

tratamientos ni fechas, aunque se observó una tendencia decreciente hacia el día 14.

Efecto del glifosato sobre la diversidad y estructura microbiana de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA)

El glifosato estimuló la diversidad de las BOA y el efecto fue diferente según los días transcurridos desde la aplicación del herbicida (**Figura 3**). Si bien a los 3 días de aplicación, comienza a observarse un incremento de la diversidad con la dosis mayor (31 mg ia.kg⁻¹s) de glifosato, el mayor valor significativo se detectó el día 7 con la aplicación de la dosis a campo (3,1 mg ia.kg⁻¹s). Luego se igualaron los tratamientos sin diferencias significativas ($P > 0,05$) con un paulatino descenso en los valores de diversidad hacia el día 21, indicando que la comunidad hacia el final del período estudiado se restablece sin diferencias entre tratamientos. Este resultado también es reflejado por la estructura de la comunidad representada en la **Figura 4**. En general, se observa la presencia de patrones de bandas similares

Tabla 1. Valores promedio y errores estándar de los parámetros microbianos determinados según los tratamientos (dosis) y días transcurridos desde las aplicaciones.

Table 1. Average values and standard errors of microbial parameters determined according to the treatments (doses) and days after applications.

	Heterótrofas	Celulolíticas	RMS ^a	C-BM ^b	q CO ₂ ^c
Tratamiento	(log ₁₀ UFC g ⁻¹ s)	(log ₁₀ n.º bact. g ⁻¹ s)	(µg C-CO ₂ d ⁻¹ g ⁻¹ ss)	(µg C g ⁻¹ ss)	(µg C-CO ₂ d ⁻¹ µg ⁻¹ CBM)
Control (sin aplicar)	3,73 ± 0,09	2,24 ± 0,09	16,32 ± 1,93	273,58 ± 30,44	0,07 ± 0,01
3,1 mg ia.kg ⁻¹ suelo	3,82 ± 0,08	2,50 ± 0,09	14,97 ± 3,18	235,21 ± 33,40	0,08 ± 0,03
31 mg ia.kg ⁻¹ suelo	3,84 ± 0,06	2,51 ± 0,09	15,53 ± 2,25	250,38 ± 14,71	0,07 ± 0,01
Día					
3	3,62 ± 0,07 b	2,23 ± 0,14 b	7,66 ± 1,22 b	312,01 ± 49,63	0,03±0,01c
7	3,77 ± 0,12 ab	2,28 ± 0,14 b	18,40 ± 3,44 a	229,00 ± 23,65	0,09±0,02ab
14	3,98 ± 0,04 a	2,96 ± 0,14 a	20,94 ± 2,84 a	215,11 ± 21,44	0,11±0,03a
21	3,84 ± 0,06 a	2,20 ± 0,14 b	15,42 ± 1,02 a	256,11 ± 9,75	0,06±0,01bc
P valor					
Trat.	NS	NS	NS	NS	NS
Día	*	*	*	NS	*
Trat. x día	NS	NS	NS	NS	NS

Letras distintas indican diferencias significativas (* $P \leq 0,05$) según LSD de Fisher.

Letters refer to significant differences (* $P \leq 0.05$) by Fisher LSD.

^a Respiración microbiana de suelo. Soil microbial respiration.

^b Carbono de la biomasa microbiana. Carbon microbial biomass.

^c Coeficiente metabólico. Metabolic quotient.

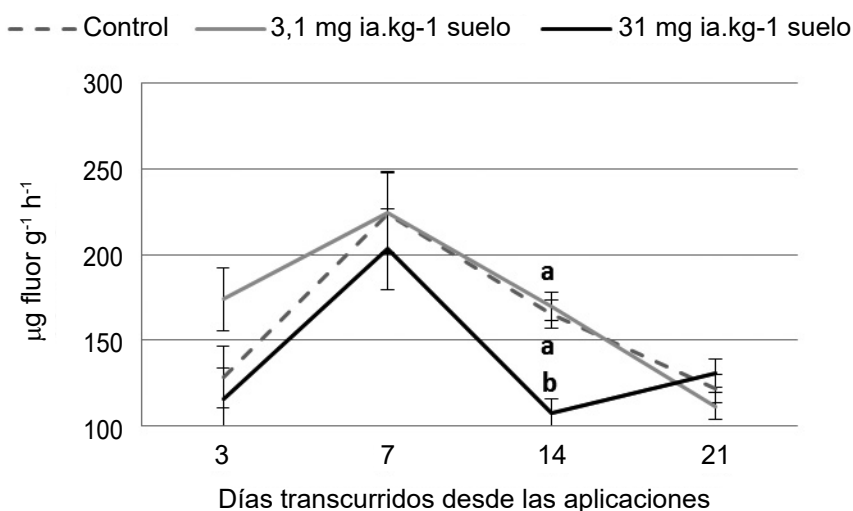


Figura 2. Valores promedio de la actividad enzimática del suelo a partir de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (DAF) (μg fluoresceína $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de suelo seco) según los tratamientos (dosis de glifosato) y días transcurridos desde las aplicaciones. Las barras indican el error estándar ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) según LSD de Fisher.

Figure 2. Average values of the enzymatic activity of the soil from the fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis (μg fluorescein $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ of dry soil) according to the treatments (doses) and days after applications. The bars indicate the standard error ($n = 3$). Different letters indicate significant differences ($P \leq 0.05$) according to Fisher's LSD.

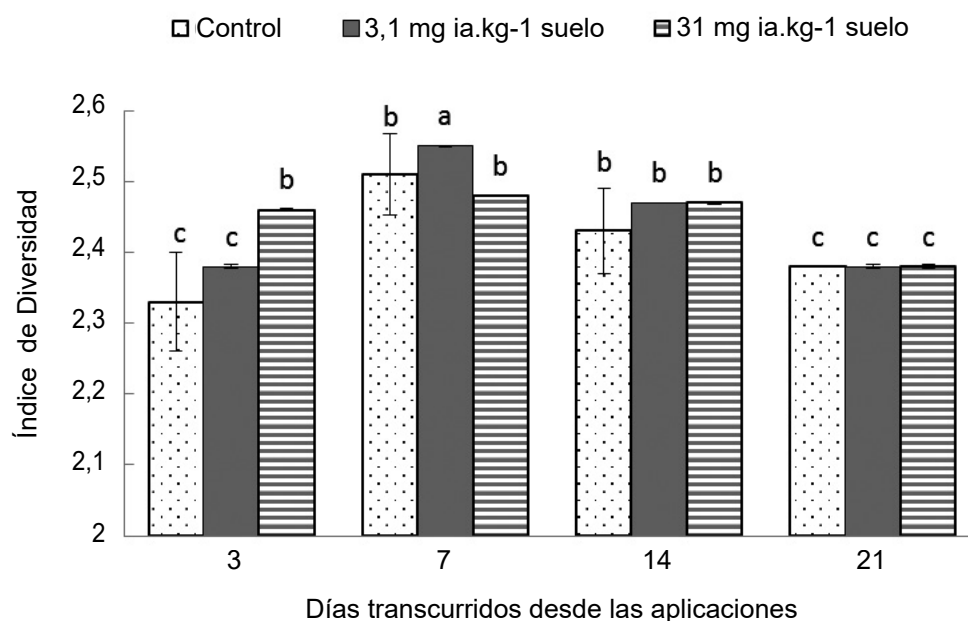


Figura 3. Valores promedio de diversidad de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) según los tratamientos (dosis de glifosato) y días transcurridos desde las aplicaciones. Las barras indican el error estándar ($n = 3$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) según DGC.

Figure 3. Average values of diversity of ammonia oxidizing bacteria (AOB) according to the treatments (doses) and days after application. The bars indicate the standard error ($n = 3$). Different letters indicate significant differences ($P \leq 0.05$) according to DGC.

tanto en número como en la intensidad, entre los días 3 y 21 y entre los días 7 y 14. Tanto al inicio (día 3) como al final del experimento (día 21) se observa que las bandas inferiores son más intensas que las superiores, lo que

podría estar indicando diferencias en la proporción de especies y por lo tanto, menor diversidad. Contrario a lo observado en los patrones de banda de los días 7 y 14, donde no se observan diferencias en la intensidad de bandas.

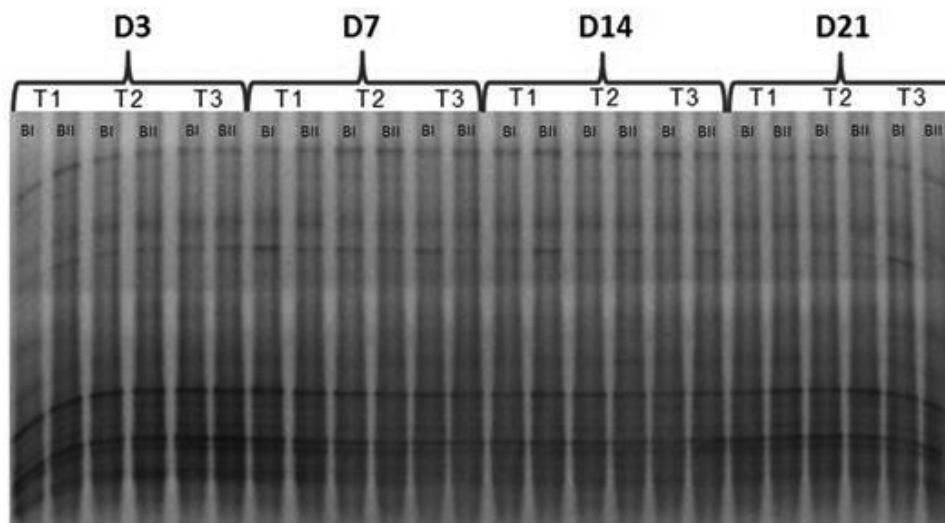


Figura 4. *Fingerprinting* molecular de BOA en DGGE. T1: Tratamiento control; T2 y T3: Tratamientos de 3,1 y 32 mg ai.kg⁻¹ s de glifosato respectivamente. D3, D7, D14 y D21: Días transcurridos desde las aplicaciones del herbicida. BI y BII: Repeticiones de campo. Nótese el patrón de bandas inferiores más oscuro en los días 3 y 21.

Figure 4. AOB molecular fingerprinting in DGGE. T1: Control treatment; T2 and T3: Treatments of 3,1 and 32 mg ai.kg⁻¹ s of glyphosate respectively. D3, D7, D14 and D21: Days after applications of the herbicide. BI and BII: Field replicates. Note the darker lower band pattern on days 3 and 21.

En el dendrograma (**Figura 5**), se reflejan las diferencias estructurales entre fechas representadas en la **Figura 4**, más que entre dosis; con un 80% de similitud, se formaron dos grupos;

en uno se agruparon las muestras de los días 7 y 14 a las que se les suman las del día 3 (D3) y dosis mayor (T3); y en el otro, aquellas con los distintos tratamientos en las fechas 3 y 21.

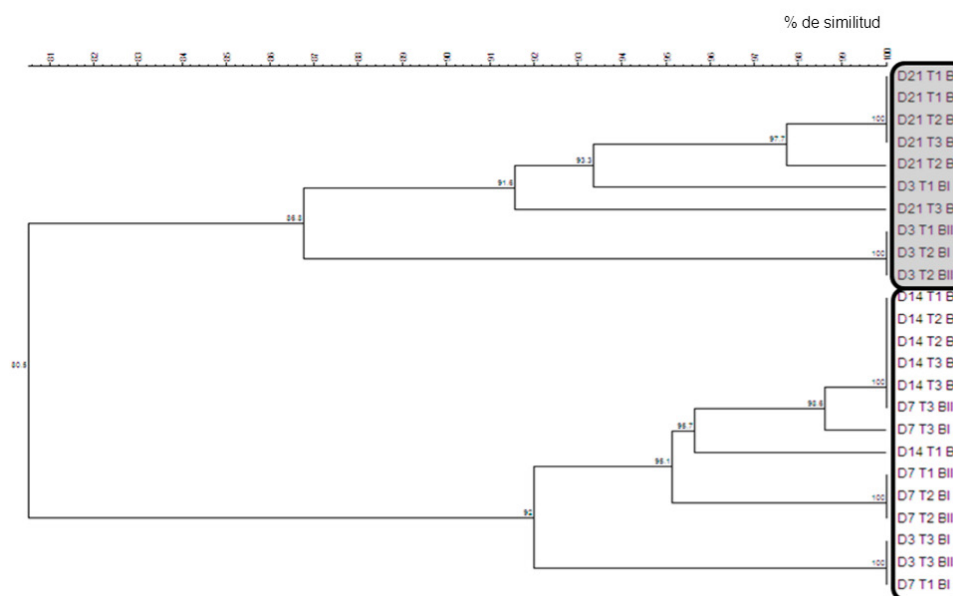


Figura 5. Dendrograma de similitud expresado en porcentaje a partir del análisis de conglomerados (AC) según Dice y UPGMA. T1: Tratamiento control; T2 y T3: Tratamientos de 3,1 y 32 mg ai.kg⁻¹ s de glifosato respectivamente. D3, D7, D14 y D21: Días transcurridos desde las aplicaciones del herbicida. BI y BII: Repeticiones de campo.

Figure 5. Similarity dendrogram expressed in percentage from the analysis of conglomerates (AC) according to Dice and UPGMA. T1: Control treatment; T2 and T3: Treatments of 3,1 and 32 mg ai.kg⁻¹ s of glyphosate respectively. D3, D7, D14 and D21: Days after applications of the herbicide. BI and BII: Field replicates

DISCUSIÓN

Bacterias del ciclo del carbono

Las poblaciones de bacterias heterótrofas aerobias y celulolíticas no fueron afectadas por la aplicación de glifosato pero sí aumentaron con los días transcurridos en el experimento, debido probablemente a la utilización de las fuentes carbonadas del suelo durante el experimento. Esto indica que, para el suelo en estudio que presenta un contenido medio de MO, el glifosato podría no representar una fuente importante de C a dosis menores a 150 mg ia.kg⁻¹ s. Al respecto, Zabaloy *et al.* (2012) en microcosmos, en un suelo de contenido medio de MO, observaron un incremento significativo en el número de bacterias totales con 150 mg ia.kg⁻¹ s de glifosato pero no detectaron cambios con la misma dosis en un suelo de alto contenido de MO (4,6%). Guijarro *et al.* (2018) tampoco detectaron cambios importantes en comunidades microbianas de suelos con historial de aplicación y alto contenido de MO (>4%) al utilizar la dosis de 3 mg ia.kg⁻¹ s a campo. Según Newman *et al.* (2016), el impacto del glifosato en las comunidades microbianas es regulado entre otros diversos factores, principalmente por el contenido de MO del suelo; y Nguyen *et al.* (2016) sostienen que la dosis de glifosato es determinante en la respuesta microbiana, estimulando el crecimiento a dosis superiores a los 100 mg ia.kg⁻¹ s. Araujo *et al.* (2003) detectaron un aumento en las bacterias totales con 2,16 mg ia.kg⁻¹ s de glifosato en un suelo con contenido medio-bajo de MO (2,3%) a los 32 días. Este resultado supone que podría existir un efecto tardío de la población bacteriana en responder a la aplicación. En relación a esto, Mijangos *et al.* (2009) observaron que el glifosato a los 15 días de aplicación, estimuló la actividad y diversidad funcional de microorganismos heterótrofos con dosis de 50 y 500 mg ia.kg⁻¹ s en un suelo con 2,72% de MO. Los autores destacaron el efecto transitorio sobre la comunidad microbiana del suelo incluso a dosis elevadas al no observar lo mismo a los 30 días de aplicado. Ratcliff *et al.* (2006) y Bórtoli *et al.* (2012) con dosis elevadas de 5000, 2000 y 200 mg ia.kg⁻¹ s, detectaron aumentos significativos en la abundancia de bacterias totales entre los 7 y 55 días de la aplicación del herbicida en suelos con más del 4% de MO.

A campo, Zabaloy *et al.* (2008), observaron incremento en la cantidad de bacterias heterótrofas aerobias en suelos con un contenido mayor al 3% de MO y con dosis de 150 mg ia.kg⁻¹ s de glifosato a los 3 días de aplicación. Los diversos hallazgos confirman que los efectos del glifosato sobre el número de bacterias además de estar influenciados por el contenido de MO del suelo, pueden ser dosis dependientes marcadamente temporales (Ratcliff *et al.*, 2006).

Bacterias del ciclo del N

En este trabajo si bien las BOA respondieron puntualmente a las dosis aplicadas sólo en los primeros días del experimento, se destaca que bajo las condiciones estudiadas, en general, los grupos funcionales bacterianos del ciclo del N respondieron positiva y temporalmente a la aplicación de glifosato demostrando mayor sensibilidad y capacidad bioindicadora que el resto de los parámetros medidos. La composición química de la molécula de glifosato es C₃H₈NO₅P (CAS 1071-83-6), lo cual podría desencadenar esta respuesta, ya sea a través del aporte de N lo que favorece a las bacterias nitrificantes (Van Eerd *et al.*, 2000; Panettieri *et al.*, 2013); como de P a las bacterias fijadoras, ya que según Frioni (2006), el mismo incide en el funcionamiento de la enzima nitrógenasa. La capacidad de estas bacterias de utilizar N y P como nutrientes también determina la respuesta, aún cuando los coloides del suelo puedan tener influencia en la adsorción de la molécula. Eberbach (1998) demostró que las primeras etapas de degradación del glifosato se producen casi exclusivamente en la fase de suelo no adsorbido, por lo que el C, N y P de la molécula podrían estar fácilmente disponibles (Busse *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren que el glifosato puede actuar como un agente de selección sobre la biodiversidad del suelo (Bozzo de Brum, 2010; Rörig, 2012). Newman *et al.* (2016) mediante secuenciamiento de muestras de suelo expuestas a glifosato, demostraron que miembros del grupo Proteobacterias aumentaron en abundancia relativa. Sin embargo, en otros trabajos Allegrini *et al.* (2015) para Eubacterias y Zabaloy *et al.* (2016) para BOA, no han detectado cambios importantes en la abundancia y diversidad. Los autores atribu-

yen sus resultados a la elevada variabilidad biológica entre microambientes, condiciones edáficas y a la adsorción del herbicida en suelos de alto contenido de MO (4,65%). Hart *et al.* (2009) tampoco observaron cambios importantes en la estructura de comunidades de hongos y bacterias desnitrificantes en un suelo con 5% de MO. Contrario a esto, Angelini *et al.* (2013) trabajando con un suelo de 1,48% de MO (contenido bajo), informaron cambios en la estructura y disminución en la abundancia y diversidad de las comunidades de bacterias fijadoras de N con la aplicación de dosis menores de 150 mg ia.kg⁻¹ s de glifosato a campo e invernáculo.

Respiración, coeficiente metabólico y C de la biomasa microbiana

La respiración microbiana de suelo (RMS) y el coeficiente metabólico (qCO_2), no cambiaron con las dosis de glifosato utilizadas, detectándose en ambos un incremento con los días. El C de la biomasa microbiana (C-BM) tampoco fue afectado por el herbicida y si bien no cambió con las fechas, se observó una tendencia de disminución. Éstos resultados confirman que el glifosato no significó una fuente importante de C y energía para el metabolismo del C en el suelo estudiado. Al mismo tiempo, existió una mayor liberación de CO₂ por unidad de C-MB. Esto determinó una baja eficiencia metabólica con el transcurso de los días provocada probablemente por una reducción progresiva del C disponible del suelo (Gomez *et al.*, 2009; Bohm *et al.*, 2011). Nguyen *et al.* (2016) a partir de un meta-análisis de varios suelos, reportaron que la respiración microbiana no cambió con dosis menores de 100 mg ia.kg⁻¹ s, indicando que bajo dichas dosis, la RMS podría ser estimulada en suelos de bajo contenido de MO comparados con los de mayor contenido. En experimentos con microcosmos Gomez *et al.* (2009) y a campo, Bozzo de Brum (2010) tampoco detectaron efecto del glifosato en la RMS trabajando con concentraciones menores de 10 mg ia.kg⁻¹ en suelos con más del 4% de MO. Mientras que, Bórtoli *et al.* (2012) en un suelo forestal con 5,39% de MO observaron un aumento significativo en la respiración pero con una dosis máxima de concentración (2000 mg ia.kg⁻¹ s);

al igual que Busse *et al.* (2001) con dosis de 500 y 5000 mg ia.kg⁻¹ s y Accinelli *et al.* (2002), con una dosis de 200 mg ia.kg⁻¹ en suelos desde 2 a 6,7% de MO.

Por otra parte, la falta de cambios en el C-BM, coinciden con otros estudios realizados en experimentos a campo y laboratorio. Según Perucci *et al.* (1999), la adsorción de pequeñas cantidades de herbicida en arcilla o MO limita los efectos de los agroquímicos en la biomasa microbiana del suelo. Liphadzi *et al.* (2005) y Bohm *et al.* (2011) con dosis similares y menores a las de este estudio en suelos con contenido de MO hasta el 2%, no observaron cambios en el C-BM a campo. En experiencias de laboratorio, Bórtoli *et al.* (2012) y Bohm *et al.* (2011) tampoco detectaron cambios importantes con dosis crecientes de glifosato hasta 2000 mg ia.kg⁻¹ s utilizando suelos con más del 3% MO. Jakelaitis *et al.* (2007) al no encontrar variación en el C-BM luego de la aplicación de agroquímicos, concluye que en suelos con alto porcentaje de MO, los herbicidas podrían no causar efecto sobre el C-BM. Por otra parte, un estudio realizado por Haney (2010) en un suelo de 1,06% de MO, reportó que el glifosato estimuló la microflora con dosis superiores a los 100 mg ia.kg⁻¹ s a los 56 días de incubación; y concluyó al igual que Accinelli *et al.* (2002) en un suelo con 2,24% MO, que el C-BM no mostró respuesta al herbicida en un corto período de tiempo aún a dosis excesivas. Esto podría estar indicando que el impacto del glifosato sobre el C-BM, además de estar condicionado por características del suelo y dosis del herbicida, dependería del tiempo transcurrido desde la aplicación (Nguyen *et al.*, 2016) al igual que la abundancia de bacterias del ciclo del C.

Actividad enzimática del suelo

La hidrólisis del diacetato de fluoresceína (DAF) ha sido propuesta para estimar la capacidad hidrolítica global del suelo (Perucci *et al.*, 1999). Esta capacidad es de enzimas extracelulares de la microflora edáfica, como proteasas, lipasas y esterases (Shaw & Burns, 2006). Según Andrighetti Scopel *et al.* (2014), la actividad enzimática microbiana es considerada un indicador sensible a los cambios en el ambiente, causados

por factores naturales o inducido por el hombre como la aplicación de pesticidas (Chowdhury *et al.*, 2008). Además la hidrólisis del DAF representa un amplio rango de la actividad biológica del suelo (Perucci *et al.*, 1999), lo que determina que sea más sensible en responder a cambios provocados por un disturbio en comparación con otras técnicas. En este trabajo, si bien para casi todas las fechas evaluadas el comportamiento de la hidrólisis del DAF fue similar entre tratamientos, en la fecha 14 respondió con una marcada disminución cuando se utilizó la mayor dosis del herbicida. De esta manera, la reducción en el contenido de fluoresceína a determinadas dosis podría estar relacionada con la reducción de la actividad microbiana de poblaciones funcionalmente activas sensibles al agroquímico (Bórtoli *et al.*, 2012). En relación a esto, si bien en este estudio no se determinaron hongos de suelo, la reducción en la DAF podría ser una consecuencia de posibles efectos adversos del glifosato sobre poblaciones de hongos, ya que según estudios realizados *in vitro* por Busse *et al.* (2001) y Meriles *et al.* (2006), el glifosato afectó principalmente a los hongos de suelo. En coincidencia, Zabaloy *et al.* (2008) en microcosmos y utilizando una dosis de 150 mg ia.kg⁻¹ s sobre un suelo Argiudol típico con 4% de MO, observaron una reducción del 14% en la actividad DAF transcurridos 7 días en comparación con un control. Un estudio de laboratorio realizado por Weaver *et al.* (2007) en un suelo con 1,1% de MO y utilizando dosis superiores a los 20 mg ia.kg⁻¹ s, detectaron una marcada reducción en la actividad microbiana total. Mientras que, Bortoli *et al.* (2012) no registró cambios en la DAF con elevadas dosis del herbicida en un suelo Haplustol típico de 5,39% de MO.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de estudio desarrolladas sobre un suelo Argiudol típico, la aplicación de glifosato no provocó cambios en la abundancia de bacterias heterótrofas aerobias, celulolíticas ni en los procesos microbianos relacionados al ciclo del C debido probablemente al contenido de materia orgánica del suelo. Sin embargo, la utilización de ambas dosis del herbicida aumentó la abundancia de las bacterias del ciclo de N, las

nitrificantes y las fijadoras. El aumento en la diversidad de las BOA fue temporal con la dosis de campo. La dosis mayor provocó una disminución significativa de la actividad enzimática del suelo para una fecha en particular. Por lo tanto, este trabajo suma evidencias de que el impacto del glifosato sobre la microbiota del suelo es variable y está condicionado por factores edáficos principalmente por el contenido de materia orgánica y dosis utilizadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alef, K. 1995. Estimation of the hydrolysis of fluorescein diacetate. In: K Alef & P Nannipieri (eds.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Pp. 232-233. Academic Press Inc., San Diego. EEUU.
- Alexander, M. 1965. Most-probable number method for microbial populations. In: CA, Black (Ed.). *Methods of soil analysis. Part 2* Pp. 1467-1472. *Soil Am. Soc. Agron.* Madison, EEUU.
- Accinelli, C; C Screpanti; G Dinelli & A Vicari. 2002. Short-time effects of pure and formulated herbicides on soil microbial activity and biomass. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 82: 519-527.
- Anderson, TH & KH Domsch. 1993. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 25: 393-395.
- Andrighetti Scopel, M; G Nachtigall Ribeiro; SC Nascimento de Queiroz; VL Ferracini & MA Záchia Ayub. 2014. Biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira. *Rev. Bras. Ciência do Solo* 38: 1643-1653.
- Angelini, J; G Silvina; T Taurian; F Ibáñez; ML Tonelli; L Valletti; MS Anzuay; L Ludueña; V Muñoz & A Fabra. 2013. The effects of pesticides on bacterial nitrogen fixers in peanut-growing area. *Arch. Microbiol.* 195: 683-692.
- Aparicio, V; E De Gerónimo; D Marino; J Primost; P Carriquiriborde & JL Costa. 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93: 1866-1873.
- Aparicio, V; E De Gerónimo; K Hernández Guijarro; D Pérez; R Portocarrero & C Vidal. 2015. Los Plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente. INTA Ediciones. Balcarce, Buenos Aires; Famaillá, Tucumán; Reconquista, Santa Fe, Argentina. 73 pp.
- Araújo, ASF; RTR Monteiro & RB Abarkeli. 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52: 799-804.

- Bloem, J; DW Hopkins & A Benedetti. 2006. Enzyme activity profiles and soil quality. In: J. Bloem; DW Hopkins & A Benedetti, (eds.). *Microbiological methods for assessing soil quality*. Pp. 158–182. CABI international.
- Bohm, GMB; L Scheneider; D Castilhos; D Agostinetto & CV Rombaldi. 2011. Controle de plantas daninhas, biomassa e metabolismo microbiano do solo em função da aplicação de glifosato ou imazetapir na cultura da soja. *Semin. Agrar.* 32: 919–930.
- Bórtoli, PV.; RA Verdenelli; C Conforto; S Vargas Gil & JM Meriles. 2012. Efectos del herbicida glifosato sobre la estructura y el funcionamiento de comunidades microbianas de dos suelos de plantaciones de olivo. *Ecol. Austral* 22: 33–42.
- Bozzo de Brum, MA. 2010. Persistencia del Glifosato y Efecto de Sucesivas Aplicaciones en el Cultivo de Soja en Agricultura Continua en Siembra Directa sobre Parámetros Biológicos del Suelo. Magister en Cs. Ambientales. Universidad de la República Oriental del Uruguay, Uruguay.
- Busse, MD; AW Ratcliff; CJ Shestak & RF Powers. 2001. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1777–1789.
- CASAFE. 2012. Informe del Mercado Argentino de productos fitosanitarios.
- Chowdhury, A; S Pradhan; M Saha & N Sanyal. 2008. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian J. Microbiol.* 48: 114–127.
- Conti, ME. 2000. Materia orgánica del suelo. En: ME, Conti (ed). *Principios de Edafología con énfasis en suelos Argentinos*. 2 da edn Pp. 67-86. Editorial Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Di Rienzo, JA; F Casanoves; M Balzarini; L Gonzalez; M Tablada & CW Robledo. 2017. Versión 2017. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
- Eberbach, P. 1998. Applying Non-steady – state Compartmental Analysis to Investigate the Simultaneous Degradation of Soluble and Sorbed Glyphosate (N-(Phosphonomethyl) glycine) in Four Soils. *Pestic. Sci.* 52: 229–240.
- Filip, Z. 2002. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agric. Ecosyst. Environ.* 88: 169–174.
- Froni, L. 2006. Anexo Práctico. En: L Froni, (ed.). *Microbiología: Básica, ambiental y agrícola*. Pp. 417-460. Facultad de Agronomía, Universidad de la República Oriental del Uruguay. Montevideo, Uruguay.
- GelCompare II. 2005. Version 4.602 of Applied Maths NV.
- Gomez, E; L Ferreras; L Lovotti & E Fernandez. 2009. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. *Eur. J. Soil Biol.* 45: 163–167.
- Guijarro, KH; V Aparicio; E De Gerónimo; M Castellote; EL Figuerola; JL Costa & L Erijman. 2018. Soil microbial communities and glyphosate decay in soils with different herbicide application history. *Sci. Total Environ.* 634: 974–982.
- Haney, RL. 2010. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Sci. Soc. Am.* 48: 89–93.
- Hart, MM; JR Powell; RH Gulden; KE Dunfield; K Peter Pauls; CJ Swanton; JN Klironomos; PM Antunes; AM Koch & JT Trevors. 2009. Separating the effect of crop from herbicide on soil microbial communities in glyphosate-resistant corn. *Pedobiología (Jena)*. 52: 253–262.
- INTA. 1978. Carta de Suelos de la República Argentina. Hoja 3363-17 Marcos Juárez. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires, Argentina.
- Jakelaitis, A; JB Santos; R Vivian & AA Silva. 2007. Atividade Microbiana e Produção de Milho (*Zea Mays*) e de *Brachiaria Brizantha* sob Diferentes Métodos de Controle de Plantas Daninhas. *Planta Daninha, Viçosa-MG* 25: 71–78.
- Jenkinson, DS & DS Powlson. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-IV. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.* 8: 209–213.
- Kogan, M & C Alister. 2013. Dinámica del glifosato en el suelo y su potencial actividad vía absorción radicular. En: A, Ríos (ed.). *Variabilidad del glifosato en sistemas productivos sustentables*. Pp. 41–50. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). La Estanzuela, Uruguay. 165 pp.
- Kowalchuk, G ; JR Stephen; W De Boer; JI Prosser; TM Embley & JW Woldendorp. 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1489–1497.
- Liphadzi, KB; K Al-Khatib; CN Bensch; PW Stahlman; JA Dille; T Todd; CW Rice; MJ Horak & G Head. 2005. Soil microbial and nematode communities as affected by glyphosate and tillage practices in a glyphosate-resistant cropping system. *Weed Sci.* 53: 536–545.
- Meriles, JM; S Vargas Gil; RJ Haro; GJ March & CA Guzman. 2006. Glyphosate and previous crop residue effect on deleterious and beneficial soil-borne fungi from a peanut-corn-soybean rotations. *J. Phytopathol.* 154: 309–316.
- Mukherjee, S; S Tripathi; AK Mukherjee; A Bhattacharyya & K Chakrabarti. 2016. Persistence of the herbicides florasulam and halauxifen-methyl in alluvial and saline allu-

- vial soils, and their effects on microbial indicators of soil quality. *Eur. J. Soil Biol.* 73: 93–99.
- Muyzer, G; E De Waal & A Uiterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695–700.
- Nakatani, AS; MF Fernandes; RA De Souza; AP Da Silva; FB Dos Reis-Junior; IC Mendes & M Hungria. 2014. Effects of the glyphosate-resistance gene and of herbicides applied to the soybean crop on soil microbial biomass and enzymes. *F. Crop. Res.* 162: 20–29.
- Newman, MM; N Lorenz; N Hoilett; NR Lee; RP Dick; MR Liles; C Ramsier & JW Kloepper. 2016. Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. *Sci. Total Environ.* 553: 155–160.
- Nguyen, DB; MT Rose; TJ Rose; SG Morris & L van Zwieten. 2016. Impact of glyphosate on soil microbial biomass and respiration: A meta-analysis. *Soil Biol. Biochem.* 92: 50–57.
- Okada, E; JL Costa & F Bedmar. 2016. Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage. *Geoderma* 263: 78–85.
- Panettieri, M; L Lazaro; R López-Garrido; JM Murillo & E Madejón. 2013. Glyphosate effect on soil biochemical properties under conservation tillage. *Soil Tillage Res.* 133: 16–24.
- Perucci, P; C Vischetti & F Battistoni. 1999. Rimsulfuron in a silty clay loam soil : Effects upon microbiological and biochemical properties under varying microcosm conditions. *Soil Biol. Biochem.* 31: 195–204.
- Ratcliff, AW; MD Busse & CJ Shestak. 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Appl. Soil Ecol.* 34: 114–124.
- Rörig, ML. 2012. Estudio de los Cambios Poblacionales de Microorganismos del Suelo Producidos por el Herbicida Glifosato. Magister en Cs. Ambientales. Universidad Nacional de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Van Eerd, LL; RE Hoagland; RM Zablotowicz & JC Hall. 2000. Pesticide Metabolism in Plants and Microorganisms: An Overview. *Pestic. Biotransformation Plants Microorg.* 777: 2–27.
- Vance, ED; PC Brooks & DS Jenkinson. 1987. An Extraction Method for Measuring Microbial Biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19: 703–707.
- Weaver, MA; LJ Krutz; RM Zablotowicz & KN Reddy. 2007. Effects of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Mississippi soil. *Pest Manag. Sci.* 1106: 388–393.
- Zabaloy, MC; JL Garland & MA Gómez. 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. *Appl. Soil Ecol.* 40: 1–12.
- Zabaloy, MC; E Gómez; JL Garland & MA Gómez. 2012. Assessment of microbial community function and structure in soil microcosms exposed to glyphosate. *Appl. Soil Ecol.* 61: 333–339.
- Zabaloy, MC; I Carné; R Viassolo; MA Gómez & E Gomez. 2016. Soil ecotoxicity assessment of glyphosate use under field conditions: Microbial activity and community structure of Eubacteria and ammonia-oxidising bacteria. *Pest Manag. Sci.* 72: 684–691.