

Universidad Nacional de Mar del Plata
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Doctorado en Ciencias: Área Biología

Tesis Doctoral

**Degradación microbiana del herbicida glifosato en
suelos agrícolas de la Región Pampeana Argentina**

Lic. (M Sc.) Keren Hernández Guijarro

Director: Dr. Leonardo Erijman

Año 2019

A mis padres

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi director Leonardo Erijman por sus valiosas sugerencias, su tiempo, su buena disposición y exigencia para lograr el mejor resultado.

A Martín Castellote y Eva Figuerola por su importante ayuda en el procesamiento bioinformático de las secuencias génicas.

Al grupo de Agrobiotecnología de la EEA Balcarce por permitirme usar las instalaciones y contar con su ayuda y apoyo. Gracias especiales a Gabriela Massa, Natalia Norero, Mónica Colavita. Silvina Divito y Cecilia Décima.

Al grupo de Pesticidas de la EEA Balcarce por facilitarme el procesamiento y lectura de muestras, así como en el mantenimiento del experimento a campo. Gracias especiales a Eduardo de Gerónimo, Luis Alonso y Maximiliano Dosantos.

Al grupo Relación Suelo-Cultivo de la EEA Balcarce por permitirme tiempo para realizar este trabajo. Gracias a Hernán Echeverría por sus palabras de aliento y confianza.

A INTA porque me ha brindado recursos financieros para realizar este trabajo a través del Plan de Capacitación y Perfeccionamiento [Res. 1029/12] y por formar parte de la Institución.

A Fernanda Covacevich por su amistad, su apoyo y generosidad.

A mis padres porque su presencia espiritual siempre me acompaña y me hace sentir que siempre se puede un poquito más.

A mi marido Sergio por su apoyo y estímulos permanentes para que finalizara esta etapa, por su amor incondicional.

A mis hijos Eneas e Irene porque su presencia me da todas las fuerzas y la alegría para seguir y lograr cosas cuando me invade la duda.

A Cuba y Argentina porque como escribiera Eduardo Galeano: “...Los mapas del alma no tienen fronteras y yo soy patriota de varias patrias”

Resumen

Esta tesis evaluó la disipación del glifosato (GP) en condiciones de campo con el objetivo de comprender cómo interactúan las propiedades físico-químicas edáficas y la estructura de la comunidad bacteriana sobre la biodegradación del GP y relacionar la presencia de genes asociados a este proceso en el suelo. Un suelo sin historial (P0) y dos agrícolas con 5 (A5) y más de 10 años (A10) de uso del herbicida fueron fumigados con GP a una dosis de 3 mg kg⁻¹. Se determinaron las concentraciones de GP y su principal metabolito: AMPA, y la dinámica de las comunidades bacterianas mediante secuenciación del gen ARN ribosomal 16S. Se analizó la abundancia del gen *thiO* en especies de *Bradyrhizobium* mediante el diseño de cebadores específicos. La historia previa de uso del GP afectó la tasa de disipación pero no su grado de degradación. El GP se degradó rápidamente, pero en P0 la tasa de disipación fue significativamente menor que en los suelos agrícolas. A pesar de las diferencias entre los sitios y entre las historias de manejo, las poblaciones bacterianas no mostraron cambios que pudieran ser asociados con la aplicación del herbicida. Las diferencias en la composición bacteriana de los tres sitios correlacionaron significativamente con el contenido de materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, pH y contenido de arcilla. La aplicación de GP provocó una disrupción parcial de la red de asociaciones bacterianas observadas en el suelo no expuesto, que fue más evidente en P0. Los altos valores de los coeficientes Kd y Kf, calculados empíricamente, fueron correlacionados con las concentraciones ambientales de GP y AMPA, no solo en estos suelos, sino también en otros 16 de la Región Pampeana, lo que sugiere que la biodisponibilidad fue un factor clave para la persistencia de ambas moléculas. Se determinó la presencia del gen *thiO* en respuesta al herbicida y la existencia, en P0, de genotipos potencialmente degradadores del GP, que fueron identificados preliminarmente dentro de los supergrupos de *B. jicamae* o *B. elkanni*.

Abstract

This thesis evaluated the glyphosate (GP) dissipation under field conditions in order to determine the relevance of the edaphic physicochemical properties and soil bacterial communities in the environmental GP degradation. To reach this goal, a soil with no record of GP application (P0) and two others with 5 (A5) and more than 10 years (A10) of herbicide use were fumigated with GP, at doses of 3 mg kg^{-1} . The GP and AMPA concentrations were determined over the time and the dynamics of soil bacterial communities were evaluated using 16S RNA ribosomal gene amplicon-sequencing. Besides, the abundance of genes related to GP degradation was quantified through the design of specific primers. The GP exposure affected the rate but not the extent of glyphosate biodegradation in the soil. Glyphosate was degraded rapidly, but P0 soil showed a significantly lower dissipation rate than A5 and A10 soils. In general, and despite both the differences between sites and the type of land use, the shifts in bacterial community structure could not be associated with the herbicide dissipation. The differences in the bacterial community structure were significantly correlated with the soil organic matter content, cation exchange capacity, pH and clay content. A partial disruption of the bacterial association network was observed after GP exposure, being more notorious at P0. The high values of the coefficients K_d and K_f , calculated empirically, were correlated with environmental concentrations of GP and AMPA, not only in the soils under study but also in others 16 of the Pampas Region, suggesting that bioavailability was a key factor for the persistence of GP and AMPA. Studies of abundance of the *thiO* gene revealed it changes in response to the herbicide and the occurrence, in P0, of *Bradyrhizobium* genotypes that could be related to the GP degradation. These genotypes were preliminary identified within the *B. jicamae* or *B. elkanni* supergroups.

Índice de contenidos

| | |
|--|-----------|
| Resumen..... | ii |
| Abstract..... | iii |
| Índice de tablas..... | vi |
| Índice de figuras..... | vii |
| Capítulo 1. Introducción General..... | 1 |
| 1.1 Características generales del glifosato..... | 2 |
| 1.2 Consumo en Argentina y el mundo..... | 3 |
| 1.3 Persistencia del glifosato en el ambiente..... | 5 |
| Capítulo 2. Degradación del glifosato en condiciones de campo y su relación con las propiedades edáficas..... | 9 |
| 2.1 Introducción..... | 10 |
| 2.1.1 Adsorción del glifosato al suelo..... | 10 |
| 2.1.2 Degradación del glifosato..... | 11 |
| 2.2 Materiales y Métodos..... | 14 |
| 2.2.1 Suelos en estudio y diseño experimental..... | 14 |
| 2.2.2 Extracción y cuantificación de glifosato y AMPA..... | 16 |
| 2.2.3 Análisis de disipación del glifosato y sus constantes de adsorción..... | 17 |
| 2.3 Resultados..... | 19 |
| 2.3.1 Disipación del glifosato en campo y su cinética..... | 19 |
| 2.3.2 Concentraciones de glifosato y AMPA en relación con las características edáficas..... | 22 |
| 2.4 Discusión..... | 25 |
| Capítulo 3. Dinámica de corto plazo de las comunidades bacterianas en función de la degradación del glifosato..... | 29 |
| 3.1 Introducción..... | 30 |
| 3.1.1 Microorganismos tolerantes y degradadores de glifosato..... | 30 |
| 3.1.2 Variaciones de la actividad microbiana ante la aplicación de glifosato..... | 32 |
| 3.2 Materiales y Métodos..... | 34 |
| 3.2.1 Extracción de ADN y secuenciación..... | 34 |
| 3.2.2 Procesamiento de los datos de secuenciación..... | 35 |
| 3.2.3. Análisis estadístico de la estructura de las comunidades bacterianas..... | 36 |
| 3.3 Resultados..... | 38 |
| 3.4 Discusión..... | 46 |
| Capítulo 4. Detección de genes funcionales relacionados con la degradación del glifosato en suelos pampeanos..... | 50 |
| 4.1 Introducción..... | 51 |
| 4.1.1 Uso de los genes funcionales como marcadores del proceso de degradación..... | 51 |
| 4.1.2 Enzimas y genes involucrados en las rutas catabólicas del glifosato..... | 52 |
| 4.1.3 <i>Bradyrhizobium</i> sp. como grupo de estudio..... | 55 |
| 4.2 Materiales y Métodos..... | 57 |
| 4.2.1 Diseño de cebadores para la amplificación del gen <i>thiO</i> | 57 |
| 4.2.2 Validación de la especificidad de los cebadores diseñados..... | 57 |
| 4.2.3 Cuantificación del gen <i>thiO</i> a partir de suelos aplicados con GP en condiciones de campo y de microcosmos..... | 59 |
| 4.2.4 Identificación de los genotipos de <i>Bradyrhizobium</i> presentes en los suelos A10 y P0..... | 62 |
| 4.3 Resultados..... | 62 |
| 4.3.1 Validación de los cebadores <i>thiO</i> | 62 |

| | |
|--|----|
| 4.3.2 Desarrollo del ensayo de q-PCR | 65 |
| 4.4 Discusión | 71 |
| Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas | 74 |
| Conclusiones | 75 |
| Perspectivas..... | 76 |
| Publicaciones generadas por esta Tesis..... | 77 |
| Referencias | 79 |
| Anexos | 99 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Historia de aplicación del glifosato en los suelos agrícolas..... | 15 |
| Tabla 2. Parámetros cinéticos para la degradación del glifosato en condiciones de campo | 21 |
| Tabla 3. Propiedades físico-químicas de los suelos estudiados..... | 22 |
| Tabla 4. Datos generados en este estudio y reportes previos de suelos pampeanos utilizados en el análisis de asociación entre la disipación del glifosato en campo y las propiedades del suelo..... | 24 |
| Tabla 5. Dinámica de las métricas de diversidad alfa en los tres suelos estudiados..... | 39 |
| Tabla 6. Correlaciones (r) y significancias (P) entre la composición de las comunidades bacterianas y las propiedades físico-químicas del suelo, determinadas mediante el test Mantel..... | 42 |
| Tabla 7. Número de interacciones entre los grupos bacterianos mayoritarios en los tres sitios ante la aplicación de glifosato para $R>0.6$ y $R>0.8$ | 44 |
| Tabla 8. Cebadores usados en las reacciones de qPCR..... | 61 |
| Tabla 9. Propiedades físico-químicas de los suelos analizados en el ensayo microcosmos para la detección del gen <i>thiO</i> de degradación..... | 69 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Rutas metabólicas planteadas para la degradación del glifosato (Tomada de Hove-Jensen <i>et al.</i> , 2014)..... | 12 |
| Figura 2. Disipación del glifosato en condiciones de campo (A) y formación de AMPA (B) en los 3 suelos estudiados..... | 20 |
| Figura 3. Variables meteorológicas de precipitaciones y temperaturas, medidas durante el experimento y de referencia correspondientes a los 10 años precedentes..... | 20 |
| Figura 4. Análisis de correlación de Spearman entre la suma de moléculas de glifosato y AMPA en suelos del sudeste bonaerense respecto a sus coeficientes empíricos Kd (izquierda) y Kf (derecha)..... | 23 |
| Figura 5. Representación en diagrama de Venn de las OTUs identificados en los tres sitios estudiados: P0, A5 y A10..... | 40 |
| Figura 6. Gráfico de análisis de coordenadas principales (PCoA) que muestra el agrupamiento de las comunidades bacterianas por sitios y tratamientos, basados en las matrices de distancias “weighted UniFrac” generadas..... | 41 |
| Figura 7. Abundancias relativas de los principales filos, a través del tiempo, detectadas en los suelos control (izquierda: A, C y E) y tratados con glifosato (derecha: B, D y F) en los tres suelos estudiados..... | 43 |
| Figura 8. Red de interdependencias de los principales filos microbianos..... | 45 |
| Figura 9. Vías de degradación del glifosato (fosfonatos) y sus metabolitos: sarcosina (N-metilglicina) y AMPA, descritas para <i>Achromobacter</i> sp. y <i>Ochrobactrum anthropi</i> . .. | 53 |
| Figura 10. Motivos conservados entre las secuencias nucleotídicas del gen glicina oxidasa (<i>thiO</i>) reportadas para especies de <i>Bradyrhizobium</i> disponibles en NCBI..... | 63 |
| Figura 11. Productos de la amplificación del gen <i>thiO</i> con los cebadores diseñados. A) A partir de la muestra de ADN del suelo con más de 10 años de historial de uso del glifosato (A10) y de la cepa <i>B. japonicum</i> E109. B) A partir de colonias transformadas con amplicones provenientes del suelo A10..... | 64 |
| Figura 12. Similitud entre los amplicones de <i>thiO</i> secuenciados y las secuencias homólogas de las glicinas oxidasas para <i>Bradyrhizobium</i> reportadas en NCBI..... | 65 |
| Figura 13. Cuantificación del número de copias del gen <i>thiO</i> y del gen <i>rpoB</i> para <i>Bradyrhizobium</i> sp. en los suelos P0 y A10, los días 0, 1, 8 y 16 después de la aplicación de glifosato..... | 67 |
| Figura 14. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en las secuencias del gen del ARNr 16S representativas de la familia <i>Bradyrhizobiaceae</i> (97%) de los suelos | |

P0 y A10 y secuencias homólogas..... 68

Figura 15. Cuantificación del número de copias del gen *thiO* en relación al gen *rpoB* de *Bradyrhizobium* en suelos agrícolas pampeanos a los 16 días posteriores a la aplicación de glifosato en ensayo de microcosmos..... 70

Capítulo 1. Introducción General

1.1 Características generales del glifosato

El Glifosato (N-[fosfonometil] glicina) (GP) es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, usado en agricultura para el control de malezas y plantas herbáceas. Es un compuesto organofosforado, sintético, inhibidor competitivo de la enzima fosfoenolpiruvato de plantas: 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintasa (EPSPS). De esta manera, interfiere en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptófano y tirosina, así como de otros ácidos benzoicos derivados, provocando la muerte de las plantas (Roberts *et al.*, 1998).

Aunque en el resto de los organismos vivos la ruta metabólica del ácido shikimico se ha perdido, no pudiendo ser afectados potencialmente por el herbicida, existen trabajos que reportan efectos tóxicos en especies acuáticas y terrestres (López *et al.*, 2012; Paganelli *et al.*, 2010; Springett y Gray, 1992), e impactos ambientales negativos derivados de su uso intensivo (Schuette, 1998).

El glifosato es un herbicida muy soluble en agua. Debido a que es una molécula que tiende a adsorberse fuertemente al suelo, es poco móvil con un potencial de lixiviación bajo. Su movilidad vertical está relacionada con el flujo preferencial por macroporos, que es facilitado por partículas en suelos muy estructurados (Kjær *et al.*, 2011). La movilidad horizontal está relacionada con los períodos de lluvia que producen el arrastre de las partículas de suelo. Este proceso está influenciado por el grado de erosión, compactación, infiltración y distribución del tamaño de los poros del suelo (Todorovic *et al.*, 2014), y se ve favorecido cuando median tiempos breves entre la aplicación del herbicida y los eventos de lluvia (Yang *et al.*, 2015). Estas situaciones provocan la contaminación de cursos de agua superficiales y subterráneos (Battaglin *et al.*, 2014; Primost *et al.*, 2017). La volatilidad del GP es despreciable debido a su baja presión de vapor, por lo que su presencia en el aire se asocia a la deriva de pulverizaciones y a la erosión eólica de partículas de suelo (Bento *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2011).

Aunque su aplicación es foliar, una concentración significativa del herbicida puede llegar al suelo, donde se adsorbe fuertemente a las partículas del medio. Su mayor concentración se ha encontrado en los primeros 5 cm del perfil, al igual que su principal metabolito: el ácido aminometilfosfónico (AMPA) (Lupi *et al.*, 2015). El GP se adsorbe a las arcillas minerales y a la materia orgánica y es excluido de estos sitios por los fosfatos inorgánicos (Schuette, 1998; Prata *et al.*, 2000; Prata *et al.*, 2003).

La degradación del GP en el suelo es principalmente microbiana (Sprankle *et al.*, 1975), mientras que la participación de factores abióticos en este proceso es insignificante (Bento *et al.*, 2016). Como producto de su degradación se forman fundamentalmente dos metabolitos: el AMPA o/y la sarcosina (Singh y Walker, 2006). La degradación del GP vía AMPA está bien documentada en el laboratorio y a campo. Sin embargo, el AMPA es degradado lentamente aun cuando las condiciones para la actividad bacteriana son óptimas, lo que aumenta su persistencia por largos períodos de tiempo en el ambiente (la Cecilia y Maggi, 2018).

1.2 Consumo en Argentina y el mundo

A nivel mundial se ha observado un aumento creciente en la aplicación del GP. Desde su comercialización en 1974, se fue adoptando su uso por el control eficiente que realizaba de las malezas, su supuesta inocuidad y principalmente por el desarrollo de variedades resistentes, modificadas genéticamente, tales como la soja, el algodón, la canola y el maíz (Myers *et al.*, 2016). En 1996, con la comercialización en los Estados Unidos Americanos (EUA) de la primera variedad de soja transgénica resistente (Roundup Ready), se produjo un aumento exponencial en el consumo de las sales de GP (Dill, 2005). Con los años se convirtió en uno de los herbicidas más usados globalmente en el control de malezas anuales y perennes, silvicultura, áreas urbanas y jardines domésticos (Székács y Darvas, 2012).

El incremento en el consumo del GP despertó interés por conocer las consecuencias

ambientales de estas prácticas, suscitando un aumento de estudios experimentales (revisado por Cerdeira y Duke, 2006; Borggaard y Gimsing, 2008; Mamy *et al.*, 2016) y estudios de modelado (la Cecilia y Maggi, 2018; Wang *et al.*, 2016), focalizados en el destino ambiental del herbicida y sus efectos.

Argentina no fue ajena a esta situación. La producción agrícola en el país se basa fundamentalmente en un paquete tecnológico que combina los cultivos transgénicos con la siembra directa y el GP, abarcando el 78,5% de la superficie agrícola, donde se aplican extensivamente alrededor de 180 a 200 millones de litros de este herbicida por año (SAyDS, 2008; Kleffman Group, 2013), con una tendencia en los últimos años hacia el uso de formulados con alta concentración de GP, mayor al 48% (CASAFE, 2015).

Gran parte del GP es usado en el barbecho químico para el control de malezas y preservación del contenido hídrico del suelo. En las principales zonas productoras del país, como la Región Pampeana, se aplica en los cultivos de soja, maíz, pasturas y girasol. En otras regiones del país también es usado para la producción de frutales de carozo y pepita, cítricos, algodón y otras producciones regionales (CONICET, 2009).

El efecto continuo de la aplicación de GP a través del tiempo ha ocasionado la emergencia de malezas resistentes que soportan mayores dosis del herbicida, problemática que es compartida mundialmente (Binimelis *et al.*, 2009; Myers *et al.*, 2016). Ante esta situación, el número de aplicaciones y las concentraciones del producto han aumentado con el objetivo de evitar las pérdidas de los cultivos y controlar la dispersión de las plantas no deseadas.

También como consecuencia de su uso masivo, estudios ambientales han encontrado tanto GP como AMPA en diferentes matrices: suelo, sedimento, agua superficial y agua subterránea (Aparicio *et al.*, 2013; De Gerónimo *et al.*, 2014; Lupi *et al.*, 2015; Okada *et al.*, 2018). En estos casos, la frecuencia de aparición de estos compuestos en el suelo es alta (mayores al 90%), lo que despierta el interés en conocer los principales factores que determinan la

persistencia del GP en el ambiente en esta región.

1.3 Persistencia del glifosato en el ambiente

El tiempo de vida media del GP en el suelo es mayor al que originalmente se planteaba, de aproximadamente 20 días (Rueppel *et al.*, 1977). Estudios a campo, han detectado tiempos de vida media que varían entre unos días hasta varios meses, dependiendo de diversos factores específicos del sitio (Myers *et al.*, 2016; Székács y Darvas, 2012).

De manera general los tiempos de vida media son menores en suelos con baja capacidad de adsorción y mayores en suelos con alta capacidad de adsorción (Al-Rajab y Shiavon, 2010). Relacionado a este aspecto, en suelos argentinos de diferentes orígenes se han reportado altos coeficientes de adsorción que varían en dependencia de los contenidos de arcilla, capacidad de intercambio catiónico, pH y contenido de fósforo. Se han observado además bajos coeficientes de desorción que pudieran limitar la biodisponibilidad del herbicida (Gómez Ortiz *et al.*, 2017; Okada *et al.*, 2016).

La adición de fosfatos inorgánicos, una práctica agrícola asociada con la fertilización, ha sido relacionada con la persistencia del GP al competir ambas moléculas por los sitios de adsorción al suelo (Prata *et al.*, 2003). Al respecto, se refiere que la aplicación de fosfatos aumenta la mineralización del herbicida en suelos con baja capacidad degradadora, pero produce un efecto nulo o negativo en suelos con altas tasas de degradación (Gimsing *et al.*, 2004).

Por otro lado, la influencia del contenido de materia orgánica sobre la adsorción del GP no es tan evidente en todos los suelos. En ocasiones, estas variables son correlacionadas negativamente y de manera específica con la fracción de sustancias húmicas (Albers *et al.*, 2009; Borggard y Gimsing *et al.*, 2008). Tanto el contenido como la calidad de la materia orgánica del suelo influyen en la composición de las comunidades microbianas edáficas

(Murphy *et al.*, 2011) por lo que esta propiedad tendría relevancia tanto en la adsorción del compuesto al suelo como indirectamente en su biodegradación.

Numerosos trabajos, a lo largo de más de 30 años, han reportado la eficiencia de diferentes cepas bacterianas para degradar el GP en condiciones de laboratorio (Sing, 2009; Sing y Walker, 2006; Fan *et al.*, 2012). La mayoría se han aislado de suelos y sedimentos contaminados y pueden utilizar la molécula de GP como fuente de Carbono (C), Nitrógeno (N) y/o Fósforo (P). En los casos en que se han ensayado sus capacidades de degradar el compuesto en el suelo, sus eficiencias disminuyen producto de variadas condiciones, tanto edáficas como ambientales (revisado por Zhan *et al.*, 2018).

A pesar del avance en este tipo de investigaciones, la identificación de comunidades degradadoras en condiciones de campo y su interacción para potenciar el proceso se ha explorado muy poco. La mayoría de los trabajos han estudiado los efectos tóxicos del herbicida sobre microorganismos edáficos y sus funciones (Busse *et al.*, 2001; Weaver *et al.*, 2007).

Los aspectos genéticos y bioquímicos de las enzimas relacionadas con la degradación del GP: las C-P liasas y las GP oxidoreductasas, no han sido abordadas exhaustivamente. Otra aproximación poco explorada es la cuantificación de la presencia y/o expresión de estos genes funcionales en el suelo y su relación con la disminución de las concentraciones ambientales del GP y sus metabolitos. Esto representa un gran desafío en ambientes complejos al tratar de identificar el mayor rango de especies microbianas edáficas que lo expresan o apuntar a grupos mayoritarios de importancia agronómica o ambiental que estén involucrados en estos procesos. Sin embargo, es importante el desarrollo de metodologías que permitan relacionar los genes funcionales con la potencialidad de las comunidades microbianas para degradar el GP en el suelo bajo condiciones de campo.

La Región Pampeana en las últimas décadas ha sufrido un importante cambio en el uso de la

tierra y la producción de cultivos, con una intensificación en el sistema productivo y en el uso de agroquímicos, particularmente del GP. La tecnología de siembra directa se ha expandido, especialmente con el cultivo de la soja, seguido por el maíz, el trigo y el girasol. Esta situación ha modificado las características del suelo (Echeverría y García, 1998; Sainz Rozas et al., 2011) con implicancias en todos los procesos relacionados. Debido a su uso intensivo, existen evidencias crecientes de alta presencia del GP en el suelo y su efecto sobre la biota edáfica (Myers *et al.*, 2016). Estudios ambientales han detectado GP y AMPA en suelos de la zona, a diferentes concentraciones, con tiempos de aplicación semejantes. Los niveles de GP y AMPA en suelos agrícolas varían entre 34.7-1502.3 y 22.3–921.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (Aparicio *et al.*, 2013). Mientras que en otros suelos bajo siembra directa los valores reportados son mayores, de 2299 y 4204 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para GP y AMPA, respectivamente (Primost *et al.*, 2017). Estos reportes tan diferentes abren un interrogante sobre qué factores determinan la persistencia del GP en los suelos de la región. En particular, cobra gran importancia entender los factores que determinan el proceso de degradación en condiciones reales de campo, para favorecer estrategias tendientes a bajar la carga ambiental del herbicida y su metabolito AMPA.

El objetivo general de esta tesis es comprender cómo interactúan las propiedades físico-químicas del suelo y la estructura de la comunidad bacteriana sobre la persistencia del herbicida GP. Para ello nos propusimos estudiar la composición y abundancia de las comunidades microbianas en suelos con distintos historiales de aplicación de GP y asociarlos a la disipación del herbicida en diferentes zonas de la Región Pampeana Argentina, así como relacionar los procesos con la presencia de los genes asociados a la degradación del GP en el suelo.

Para ello nos planteamos las siguientes hipótesis y objetivos.

Hipótesis

- I. El historial de aplicación del glifosato modifica la estructura de las comunidades microbianas, favoreciendo la selección de microorganismos edáficos nativos degradadores del herbicida.
- II. La biodegradación del herbicida glifosato está determinada por la interacción entre las propiedades físico-químicas del suelo y la estructura de las comunidades microbianas.

Objetivos específicos:

1. Determinar la diversidad microbiana en relación a la dinámica de degradación de glifosato en suelos de la Región Pampeana, utilizando métodos de secuenciación paralela masiva.
2. Analizar la relación entre la degradación del glifosato, la estructura de la comunidad bacteriana y las propiedades edáficas en suelos con diferentes historiales de aplicación utilizando análisis multivariados.
3. Establecer marcadores para cuantificar la abundancia de genes involucrados en la degradación del glifosato en suelos agrícolas mediante la técnica de PCR en tiempo real.

Los Objetivos 1 y 2 son abordados en los Capítulos 2 y 3 y el Objetivo 3 es desarrollado en el Capítulo 4 de esta Tesis.

Capítulo 2. Degradación del glifosato en condiciones de campo y su relación con las propiedades edáficas

2.1 Introducción

2.1.1 Adsorción del glifosato al suelo

Una vez que el GP es aplicado, llega al suelo y se adhiere a sus partículas. De esta manera puede estar más o menos disponible, dependiendo de la reversibilidad del equilibrio de adsorción. El GP tiene tres grupos funcionales polares (amino, carboxilo y fosfato) que pueden unirse a cationes metálicos polivalentes. Se han propuesto varios mecanismos para describir la interacción entre el GP y las partículas de suelo. Sin embargo, los principales factores que controlan este proceso no están claramente establecidos porque varían según el tipo de suelo.

Entre los mecanismos propuestos se plantea la interacción entre el grupo fosfato del GP y los grupos OH-Fe y OH-Al que se encuentran en la superficie de minerales cargados del suelo, como silicatos y óxidos de Fe y Al. También se considera la formación de complejos entre el grupo fosfato del GP y los cationes polivalentes intercambiables del suelo (Borggaard y Gimsing, 2008; Ololade *et al.*, 2014).

Otro mecanismo propuesto es la adsorción a las sustancias húmicas mediante puentes de hidrógeno a pH ácido o neutro (da Cruz *et al.*, 2007; Gimsing y Borggaard, 2002; Ololade *et al.*, 2014). El pH es considerado un factor determinante porque su aumento conduce a un incremento de las cargas negativas, tanto en el suelo como en la molécula, lo que resulta en una mayor repulsión electrostática (Ololade *et al.*, 2014).

Por último, se propone la competencia por los sitios de adsorción entre el GP y los fosfatos, basada en que ambos presentan mecanismos similares de adsorción (da Cruz *et al.*, 2007).

En la búsqueda de funciones matemáticas que permitan predecir las propiedades de los suelos relacionados con la capacidad de adsorción de plaguicidas al suelo, Weber *et al.* (2004) propusieron una función de pedotransferencia para inferir el coeficiente lineal de adsorción

(Kd) de diferentes plaguicidas. Más recientemente, Dollinger *et al.* (2015) propusieron una función específica para el GP, desarrollada y probada en un amplio rango de suelos a través del mundo, en la cual Kd está fundamentalmente relacionada con la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y el contenido de arcilla. Al respecto, De Gerónimo *et al.* (2018) propusieron una función para predecir la constante de Freundlich (Kf) basados en las isothermas de adsorción de diferentes suelos agrícolas de Argentina, seleccionando el pH y el contenido de arcilla como los parámetros más importantes que gobiernan este proceso, y en menor medida los valores de Al intercambiable y P Bray.

Los suelos de la Región Pampeana en las últimas décadas han experimentado una disminución de la materia orgánica y fósforo en magnitud variable consecuencia de una intensificación del sistema productivo (Echeverría y García, 1998; Sainz Rozas *et al.*, 2011), donde el GP se aplica intensiva y extensivamente. El estudio de la disipación del herbicida en el campo no ha sido abordado con anterioridad y las propiedades edáficas que pudieran relacionarse con este proceso en esta zona han sido abordadas escasamente y bajo condiciones controladas (Okada *et al.*, 2017).

2.1.2 Degradación del glifosato

El GP es moderadamente persistente en el ambiente y su tiempo de vida media es de 30-170 días (Tomlin, 2000). Sin embargo, este parámetro va a depender de su biodisponibilidad y de la composición y la actividad de las comunidades de microorganismos edáficos degradadores del herbicida. A su vez, existen prácticas de manejo agrícola y de uso del suelo que influyen indirectamente en este proceso al modificar tanto la diversidad estructural y funcional de las poblaciones microbianas (Berg y Smalla, 2009; Girvan *et al.*, 2003; Lauber *et al.*, 2008), como las propiedades edáficas (Galantini y Rosell, 2006; Sainz Rozas *et al.*, 2011), que pudieran relacionarse con la retención de la molécula en el suelo.

El catabolismo del GP por los microorganismos ocurre por dos vías alternativas (Figura 1), en las que se forman los metabolitos principales sarcosina o N-metil glicina y ácido amino metil fosfónico (AMPA).

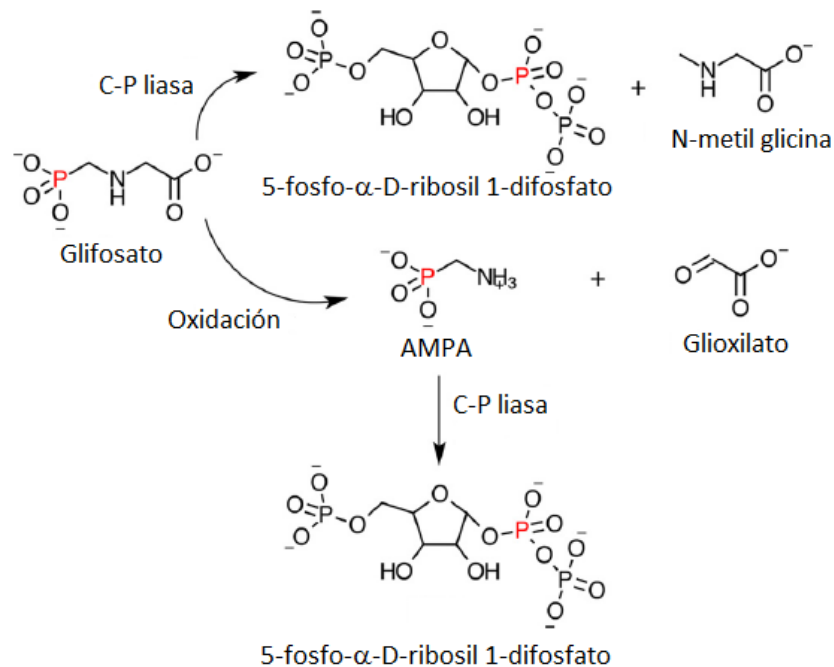


Figura 1. Rutas metabólicas planteadas para la degradación del glifosato (Tomada de Hove-Jensen *et al.*, 2014).

Tanto el herbicida como sus intermediarios catabólicos pueden ser degradados completamente y los microorganismos pueden aprovechar sus productos finales como fuente de energía (Wang *et al.*, 2016). Después de largas exposiciones al herbicida, las bacterias se han adaptado a usar la molécula como fuente de C, N y P (Sviridov *et al.*, 2012).

La aplicación repetida del mismo plaguicida por muchos años facilita que la biota del suelo lo degrade más rápidamente (James *et al.*, 2010). Sin embargo, este proceso depende de los intervalos entre las aplicaciones y de la estabilidad de la microbiota activa (Kaufman *et al.*, 1985).

Al respecto existen resultados contrapuestos en la bibliografía que reportan mayores tasas de degradación en suelos con historial de uso del GP (Araujo *et al.*, 2003) y tasas de

mineralización que disminuyen después de repetidas aplicaciones (De Andrea *et al.*, 2003) y al aumentar las concentraciones del herbicida (Weaver *et al.*, 2007).

Otros autores argumentan que la degradación ocurre en dos fases, una rápida relacionada con la acción microbiana sobre el GP libre y otra lenta relacionada con la acción sobre el GP adsorbido (Alexa *et al.*, 2009; Veiga *et al.*, 2001). Un trabajo más reciente apunta que la disipación del GP es más rápida en climas cálidos y húmedos, por lo cual las aplicaciones repetidas en barbecho o cultivos de invierno en climas fríos y secos pueden aumentar el riesgo de persistencia en el ambiente (Bento *et al.*, 2016).

En la actualidad, el desarrollo de experimentos en condiciones de microcosmos ha permitido avanzar en el conocimiento de los procesos de retención y degradación del herbicida. Sin embargo, tienen la limitante que generalmente emplean suelo homogeneizado que ha perdido su estructura original. Generar conocimiento en ensayos a campo tiene la ventaja de respetar las condiciones naturales del ecosistema: la composición de micro y macroagregados del suelo, su porosidad, la topografía, así como las interacciones en tiempo y espacio de las comunidades microbianas edáficas y las variables ambientales.

Este capítulo tuvo como objetivos estudiar la degradación del GP en suelos con diferente historial de uso del herbicida en condiciones de campo y relacionar las propiedades edáficas con las tasas de disipación del herbicida en el suelo.

Se pusieron a prueba las siguientes hipótesis:

- La tasa de disipación del glifosato en el campo es mayor en suelos con más historial de aplicación del herbicida.
- Los contenidos de materia orgánica y de arcilla del suelo están relacionados positivamente con la persistencia del glifosato en el campo.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Suelos en estudio y diseño experimental

Se seleccionaron tres sitios localizados en la EEA INTA de Balcarce, provincia de Buenos Aires, para la realización de un ensayo a campo llevado a cabo durante los meses de noviembre de 2013 y febrero de 2014.

Los sitios seleccionados fueron: P0 (coordenadas: S37°45'47.9"WO58°18'28.4"), sin historial previo de aplicación de GP, que pertenecía a un predio usado como cancha de fútbol por los últimos 50 años, rodeado por columnas de árboles; y dos sitios suelos agrícolas con historial de aplicación del GP: A5 (coordenadas: S37°45'49.7" WO58°17'33.1"), con 5 años de aplicación y A10 (coordenadas: S37°45'17.4" WO58°17') con más de 10 años de historial. Los suelos agrícolas (A5 y A10) fueron manejados con labranza convencional en rotaciones maíz-trigo/soja. El historial de uso y dosis de herbicida aplicados en los últimos 5 años, anteriores a este experimento, se muestran en la Tabla 1. Todos los suelos estudiados son clasificados como Phaeozem Luvicos (IUSS Working GroupWRB, 2007).

En cada sitio se llevó a cabo un diseño experimental de bloques aleatorizados con 6 parcelas de 10 m² cada una, a suelo desnudo. De las 6 parcelas, a tres de ellas se les aplicó, uniformemente y de manera manual con mochila, glifosato comercial (DuPont® Premium HL 48% w/v) a una dosis de 3 mg de ia kg⁻¹ de suelo, considerando una profundidad de 5 cm y una densidad aparente de 1.2 t m⁻³. A las restantes 3 parcelas no se les aplicó herbicida y constituyeron los controles sin aplicación.

Las muestras de suelo fueron colectadas un día previo a la aplicación y a los 1, 3, 5, 8, 16, 24, 32, 44 y 76 días posteriores. Cada muestra estuvo compuesta por 10 submuestras de suelo por parcela, colectadas a una profundidad de 0-5 cm mediante un muestreador tipo barreno, que fue flameado entre muestreos para evitar contaminación cruzada.

Tabla 1. Historia de aplicación del glifosato en los suelos agrícolas

| Campañas de Cultivo | Dosis de GP aplicadas (L ha ⁻¹) | |
|---------------------|---|--|
| | Suelo A_10 | Suelo A_5 |
| 2007-2008 | 5 L ha ⁻¹ estándar | 4 L ha ⁻¹ estándar 4 L ha ⁻¹ estándar |
| 2008-2009 | 3 L ha ⁻¹ estándar 5 L ha ⁻¹ estándar 5 L ha ⁻¹ estándar 6 L ha ⁻¹ estándar | 3 L ha ⁻¹ estándar 3.5 L ha ⁻¹ estándar 4 L ha ⁻¹ estándar 4 L ha ⁻¹ estándar |
| 2009-2010 | 3.5 L ha ⁻¹ estándar | 3 L ha ⁻¹ estándar 4 L ha ⁻¹ estándar 4 L ha ⁻¹ estándar 4 L ha ⁻¹ estándar |
| 2010-2011 | 3.5 L ha ⁻¹ estándar 3 L ha ⁻¹ premium 4 L ha ⁻¹ premium 4.5 L ha ⁻¹ premium 2.5 L ha ⁻¹ premium | 4.5 L ha ⁻¹ estándar 3 L ha ⁻¹ premium 3.5 L ha ⁻¹ premium 3 L ha ⁻¹ premium |
| 2011-2012 | 3.5 L ha ⁻¹ premium 3.5 L ha ⁻¹ premium 3.5 L ha ⁻¹ premium 4.5 L ha ⁻¹ premium | 3.5 L ha ⁻¹ premium 3.5 L ha ⁻¹ premium 3.5 L ha ⁻¹ premium 4.5 L ha ⁻¹ premium |
| 2012-2013 | 2.5 L ha ⁻¹ premium 4 L ha ⁻¹ premium 3 L ha ⁻¹ premium 4.5 L ha ⁻¹ premium | 2.5 L ha ⁻¹ premium 3.5 L ha ⁻¹ premium 3 L ha ⁻¹ premium 3.5 L ha ⁻¹ premium |

Estándar < 480 i.a. L⁻¹ o kg⁻¹; Premium ≥ 600 i.a. L⁻¹ o kg⁻¹

Posteriormente, las muestras fueron homogeneizadas y separadas en dos partes: una porción fue destinada a la extracción del material genético, para lo cual el suelo fue trasladado en frío hasta el laboratorio para su procesamiento inmediato y la otra porción se secó a 30 °C y se tamizó (5 mm y 2 mm) para la determinación de parámetros físico-químicos del suelo.

La textura de los suelos, descrita en relación a sus contenidos de arena, limo y arcilla, se determinó por el método de la pipeta de Robinson (Gee y Bauder, 1986). El pH se midió en suspensión suelo-agua con relación 1:2,5 mediante un potenciómetro con electrodo combinado. El carbono orgánico total (COT) fue medido por titulación, con sal de Mohr, del dicromato de potasio residual a la reducción del carbono de la submuestra, de acuerdo con la

metodología descrita por Walkley (1947). Este dato fue corroborado mediante la determinación de la materia orgánica (MO) por el método de calcinación (Nelson y Sommers, 1982). La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se determinó por el método del acetato de amonio a pH 7 (Chapman, 1965) y el fósforo disponible mediante procedimientos estándares (Bray y Kurtz, 1945).

Los datos de temperatura y precipitaciones a lo largo del experimento fueron colectados en la Estación Meteorológica de INTA EEA Balcarce (<http://anterior.inta.gov.ar/balcarce/info/meteorologia/meteoro2.htm>).

2.2.2 Extracción y cuantificación de glifosato y AMPA

Para realizar la extracción de GP y AMPA, se tomaron 5 gramos de suelo seco, se mezclaron con 50 μ l de GP marcado isotópicamente (10 mg L⁻¹) (1,2 ¹³C ¹⁵N, Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el material particulado fue extraído mediante la adición de 25 ml de una solución extractante (100 mM Na₂B₄O₇ · 10 H₂O; 100 mM K₂HPO₄; pH=9, grado reactivo) y el extracto fue analizado según la metodología propuesta por Peruzzo *et al.* (2008) descrita a continuación.

Brevemente, las muestras fueron sonicadas durante 3 períodos de 10 min cada uno y centrifugadas 10 min a 1500 g para separar el material suspendido. Los sobrenadantes fueron derivatizados en igual volumen (2 ml) de 9-fluorenilmetilclorofomato (FMOC-Cl), 1 mg ml⁻¹ en acetonitrilo (Sigma, grado HPLC), y se incubaron durante 15 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. Seguidamente se añadieron 5 ml de diclorometano (CH₂Cl₂, grado HPLC), se agitó y se centrifugó 10 min a 1500 g. Finalmente la fase acuosa fue colectada y filtrada a través de un filtro de nylon 0.22 μ m previo a la corrida cromatográfica.

Paralelamente fueron preparadas soluciones estándares de GP (Pestanal®, Sigma) y AMPA (Sigma-Aldrich) en solución extractante en concentraciones de 0, 1, 10, 50, 100 y 200 μ g L⁻¹ de cada analito. Para evaluar el GP recobrado de las muestras, se añadieron 4 μ L de 10 mg L⁻¹

de GP marcado isotópicamente a la serie de diluciones mencionadas anteriormente. Los estándares se derivatizaron y se procesaron por la misma metodología descrita arriba.

Las muestras y los estándares se inyectaron en un sistema Waters® ACQUITY® de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC MS/MS), (Waters, USA). Para la separación de los analitos se usó una columna ACQUITY®UPLC BEHC18, (1.7 μm , 50 \times 2.2mm) (Waters, USA), operando a 60 °C, a un flujo de 0,5 ml min⁻¹ y un volumen de inyección de 20 μL , administrados desde una unidad de muestreo automático termostatazada. Como fase móvil se utilizó un gradiente de metanol y agua, conteniendo 5 mM de acetato de amonio. El metanol y el agua fueron reactivos grado HPLC. La calibración de las curvas estándares se realizó mediante una regresión por mínimos cuadrados ponderados 1 / x, considerando una linealidad satisfactoria cuando $R^2 \geq 0,99$. La recuperación de GP en el suelo estuvo entre 70 y 100%.

Para el análisis cromatográfico se utilizó el software operativo Masslynx 4.1 y su paquete Targetlynx con optimización de los parámetros de integración a partir de cromatogramas representativos de cada una de las matrices. La cuantificación se realizó a través del método del estándar externo usando el área cromatográfica como parámetro de cuantificación, considerando las diluciones según el tipo de matriz, el efecto matriz y la recuperación en cada caso.

2.2.3 Análisis de disipación del glifosato y sus constantes de adsorción.

La disipación del glifosato se explicó usando un modelo cinético de primer orden:

$$G_{Pt} = G_{Po} e^{-kt}$$

donde G_{Pt} (mg kg⁻¹) es la concentración al tiempo t (en días), G_{Po} es la concentración inicial promedio ($n = 3$), y k es la constante de disipación de primer orden (días⁻¹). Además se calculó el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) mediante la ecuación:

$$t^{1/2} = \ln 2/k.$$

La cinética de primer orden fue ajustada usando mínimos cuadrados no lineales incluido en el paquete estadístico R (R Core Team, 2017). Las diferencias estadísticas entre las medias de las constantes de disipación del glifosato de primer orden (k) en los tres sitios fue analizada mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$).

Para comparar el ajuste logrado por la cinética de primer orden, se calculó además la disipación del glifosato en función del tiempo (k), mediante el uso de una ecuación relacionada que permitió obtener la velocidad máxima (V_{\max}) y la constante de Michaelis–Menten (K_M) (Schnell y Mendoza, 1997) mediante la introducción de la función Omega (W), usada en el tratamiento de sistemas no lineales, donde la independencia de las variables no es clara:

$$[GP]_t = K_M W \left(\frac{[GP]_0}{K_M} \exp \left(- \frac{V_{\max} + [GP]_0}{K_M} \right) \right)$$

La función Omega (W), satisface la ecuación trascendental: $W(x)\exp(W(x)) = x$ (Schnell y Mendoza, 1997). La bondad del ajuste fue estimado mediante la raíz del error cuadrático medio normalizado (NRMSE). Los valores de V_{\max} y K_M fueron iterados minimizando el valor de NRMSE, indicativo del grado de ajuste del modelo.

La ecuación para calcular NRMSE fue la siguiente:

$$NRMSE = \left(\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - Y_i)}{n} / [\max(Y) - \min(Y)] \right)$$

donde X y Y son las concentraciones empíricas y medidas respectivamente, y n es el número de puntos.

Para relacionar las propiedades de los suelos con su capacidad para adsorber el GP, se calcularon empíricamente las constantes de adsorción lineal y no lineal: K_d y de Freundlich (K_f), respectivamente, según lo propuesto por Dollinger *et al.* (2015). Las funciones de

pedotransferencia utilizadas fueron:

$$K_d (\text{L kg}^{-1}) = 7.20 * \text{CIC} - 1.31 * \text{Arcilla} + 24.82$$

$$K_f (\text{L kg}^{-1} \text{ n}^{-1}) = 50.904 + 9.246 * \text{CIC} - 1.985 * \text{Arcilla} - 11.811 * \text{CO}$$

(CIC expresado en cmol kg^{-1} , el contenido de arcilla y el carbono orgánico en porcentajes (%), teniendo en cuenta que $\% \text{CO} = \% \text{MOS}/1.724$).

Las constantes K_d y K_f fueron comparadas con la constante de disipación (k) mediante un análisis de correlación usando el coeficiente Rho de Spearman.

Para confirmar la relación entre las propiedades de los suelos y su capacidad para adsorber GP y AMPA, estos resultados fueron relacionados con un set de datos 16 suelos diferentes del sudeste de la provincia de Buenos Aires, caracterizados según sus propiedades físico-químicas y con mediciones ambientales de GP y AMPA reportadas por Aparicio *et al.* (2013). Para ello los valores de K_d y K_f se calcularon empíricamente según lo detallado anteriormente y los análisis de correlaciones fueron realizados con la suma de las moléculas de GP y AMPA reportadas para cada suelo (moles de GP/AMPA kg^{-1} suelo). Estos análisis no consideraron las concentraciones iniciales del herbicida y el historial de uso del producto. Para los suelos del ensayo en campo: P0, A5 y A10, se calculó la suma de GP y AMPA en el día 42 posterior a la aplicación y se incluyeron estos valores en los análisis con las constantes de adsorción.

2.3 Resultados

2.3.1 Disipación del glifosato en campo y su cinética

La Figura 2 muestra que el GP fue degradado en condiciones de campo en los tres tipos de suelos, independientemente de su historial previo de exposición al herbicida. En este sentido no se observó una fase lag o de retardo en el inicio de la degradación en el suelo sin previo uso del producto. Las pérdidas de GP aplicado por lixiviación y escurrimiento, se

consideraron despreciables debido a que no ocurrieron eventos de lluvias intensas durante el desarrollo del experimento (Figura 3).

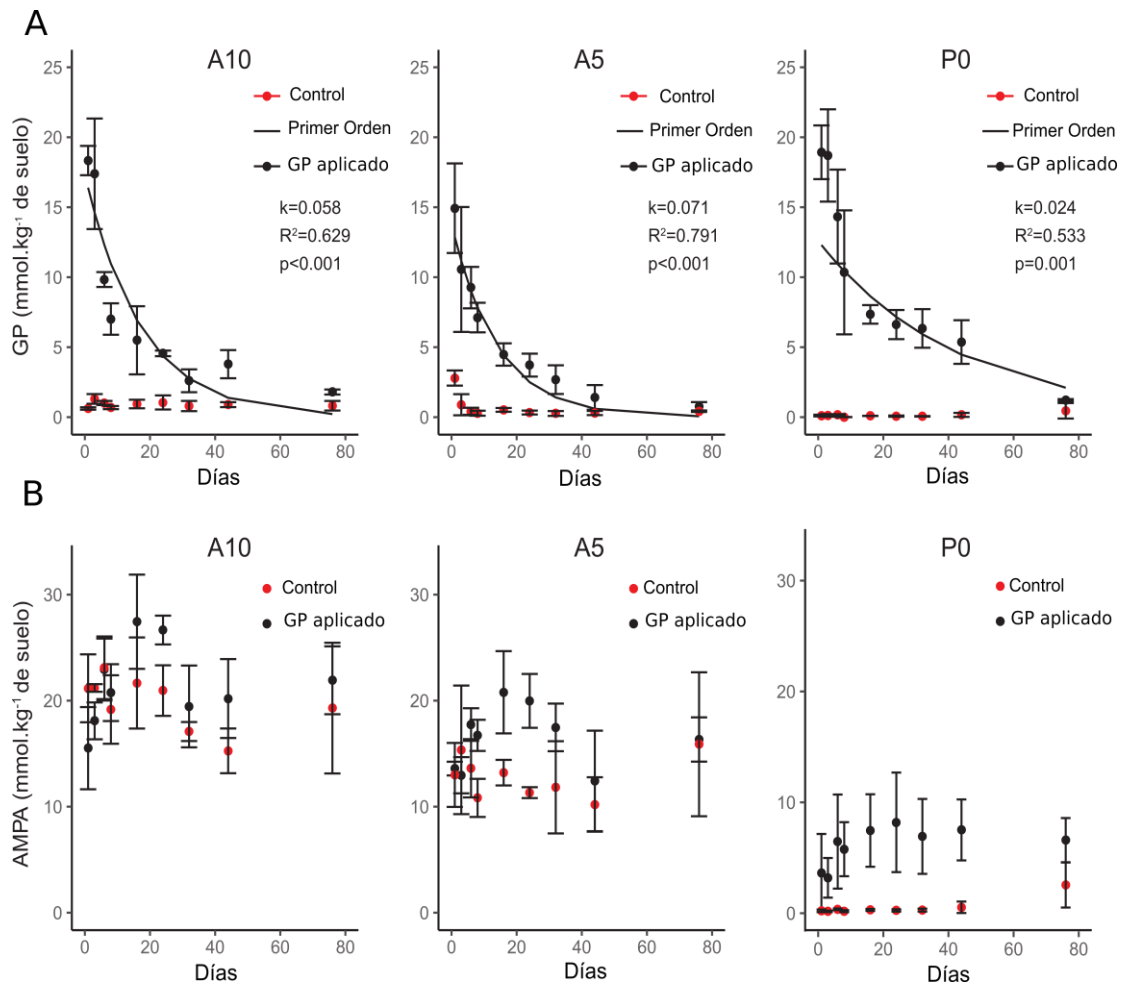


Figura 2. Disipación del glifosato en condiciones de campo (A) y formación de AMPA (B) en los 3 suelos estudiados. Se graficaron 2 tratamientos - suelo aplicado con glifosato y suelos control sin aplicación - para cada suelo – A10 y A5: suelos agrícolas con más de 10 y 5 años de aplicación del herbicida, respectivamente; P0: suelo sin uso del glifosato. Las barras verticales representan la desviación del error estándar ($n=3$).

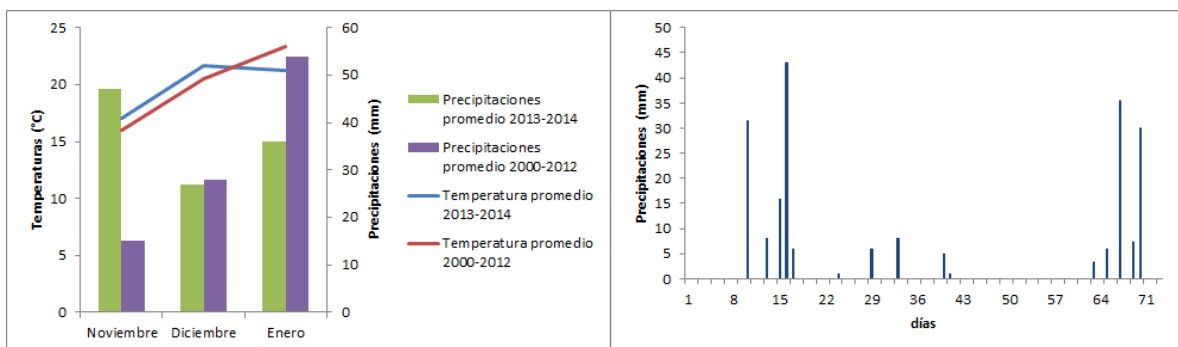


Figura 3. Variables meteorológicas, de precipitaciones y temperaturas, medidas durante el experimento y de referencia correspondientes a los 10 años precedentes.

La disipación del GP siguió una cinética de primer orden ($p < 0.05$) y las tasas de degradación difirieron significativamente entre sitios ($p \leq 0.001$; Figura 2A). Al comparar el ajuste de disipación del GP mediante un modelo Michaelis-Menten en relación al de primer orden, se obtuvo que los valores de $V_{\text{máx}}/K_m$ fueron similares a las constantes de disipación k obtenidas en el primer caso, igualmente los valores de NRMSE en ambos casos no difirieron (Tabla 2), lo que permitió corroborar el tipo de cinética observada en el campo.

Tabla 2. Parámetros cinéticos para la degradación del glifosato en condiciones de campo.

| Suelos | Cinética de Michaelis -Menten | | Cinética de Primer orden | |
|--------|-------------------------------|-------|--------------------------|-------|
| | $V_{\text{máx}}/K_m$ | NRMSE | k | NRMSE |
| A10 | 0.0575 | 0.497 | 0.0576 | 0.497 |
| A5 | 0.064 | 0.374 | 0.071 | 0.369 |
| P0 | 0.042 | 0.489 | 0.024 | 0.490 |

Las tasas de degradación, medidas a través de la constante k , de los suelos agrícolas fueron mayores respecto del suelo sin historial y no difirieron entre ellas. Consecuentemente, el tiempo de vida media del GP en P0 fue más del doble que en A10. Los valores de estas variables en los dos suelos agrícolas no difirieron estadísticamente entre sí, independientemente de las dosis de herbicidas aplicadas por año y del número de años de historial de uso del producto (Tabla 3).

Los niveles del principal metabolito del catabolismo del GP, el AMPA, aumentaron hasta el día 24 y posteriormente se mantuvieron elevados en todos los suelos a lo largo del experimento (Figura 2B). En el suelo A10, el aumento de las concentraciones de AMPA fue menos notorio porque los niveles iniciales de esta molécula en el suelo, antes de la aplicación, fueron los más elevados. Las concentraciones de GP y AMPA detectadas en una de las 3 parcelas control del sitio P0, hacia el final del experimento, sugieren una posible

dispersión del herbicida, ya sea por deriva eólica de partículas de suelo con GP adherido o de aplicaciones del herbicida provenientes de áreas de producción agrícolas cercanas, teniendo en cuenta que durante esa época del año es común las aplicaciones de GP en la zona.

Tabla 3. Propiedades físico-químicas de los suelos estudiados.

| <i>Propiedades de los suelos</i> | <i>A10_Balcarce</i> | <i>A5_Balcarce</i> | <i>P0_Balcarce</i> |
|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Coordenadas | S37°45'17.4'' WO58°17'51.8'' | S37°45'49.7'' WO58°17'33.1'' | S37°45'47.9'' WO58°18'28.4'' |
| Dosis de GP en el último año (mg ia kg soil ⁻¹) | 4.30 | 12.80 | - |
| MO(%) | 5.0 ± 0.45 (b) | 4.1 ± 0.51 (b) | 10.6 ± 0.92 (a) |
| pH | 5.70 ± 0.10 | 5.80 ± 0.06 | 6.10 ± 0.15 |
| CIC (cmol kg ⁻¹) | 25.00 ± 0.75 (b) | 27.50 ± 5.44 (b) | 40.40 ± 2.59 (a) |
| Arena (%) | 46.80 ± 3.15 (a) | 40.40 ± 2.07 (b) | 39.50 ± 2.28 (b) |
| Limo (%) | 29.20 ± 3.37 | 33.40 ± 1.80 | 30.50 ± 2.68 |
| Arcilla (%) | 24.60 ± 1.83 (b) | 26.10 ± 1.45 (b) | 29.20 ± 1.47 (a) |
| P-Bray (mg kg ⁻¹) | 58.46 ± 9.89 (a) | 24.01 ± 2.28 (c) | 28.27 ± 1.64 (b) |
| constante <i>k</i> (días ⁻¹) | 0.058 ± 0.016 (a) | 0.071 ± 0.011 (a) | 0.024 ± 0.017 (b) |
| <i>t</i> ^{1/2} (días) | 11.95 | 9.76 | 28.87 |
| Kd (L kg ⁻¹)* | 172.59 ± 7.88 | 188.63 ± 5.74 | 277.45 ± 27.35 |
| Kf (L kg ⁻¹)* | 199.39 ± 8.88 | 225.57 ± 6.26 | 292.47 ± 32.46 |

MO: contenido de material orgánica, CIC capacidad de intercambio catiónico.

Letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios (p< 0.05)

(*) Funciones de pedotransferencia de acuerdo a Dollinger *et al.* (2015).

2.3.2 Concentraciones de glifosato y AMPA en relación con las características edáficas

El uso de las funciones Kd y Kf empíricas como una manera aproximada de predecir el grado de adsorción del GP al suelo fueron aplicadas a los suelos en estudio. En tal sentido, el suelo P0 mostró los valores más elevados de Kd y Kf, calculados según Dollinger *et al.* (2015), sugiriendo que la molécula se adsorbe más fuertemente en este suelo, que presenta los valores más altos de contenido de materia orgánica, arcilla y CIC en comparación con los suelos agrícolas (Tabla 3).

Además, al analizar la relación entre estas constantes de adsorción y la velocidad de disipación en campo, expresados mediante la constante k , se halló una correlación negativa entre ambas (k/K_d : $r=-0.73$, $p=0.025$ y k/K_f : $r=-0.80$, $p=0.009$), indicando que el suelo con mayor capacidad para adsorber GP mostró la tasa de disipación del glifosato más lenta.

Para corroborar la relación entre las propiedades de los suelos y la disipación total del GP en campo, además de los datos obtenidos en este ensayo, incluimos en el análisis datos de suelos agrícolas de la región Pampeana, específicamente del sudeste, para los cuales existía el reporte de concentraciones ambientales del herbicida y su principal metabolito AMPA (Tabla 4).

La cantidad residual de GP y AMPA correlacionó significativamente tanto para el K_d (Spearman $r=0.4702$; $p=0.04221$) como para el K_f ($r=0.4789$, $p=0.03802$), aún cuando no fueron consideradas las diferencias entre las dosis de herbicidas aplicadas, así como el tiempo transcurrido después de la última aplicación reportada (Figura 4). Ninguna propiedad edáfica, de manera individual, estuvo relacionada con la suma de moléculas o sus valores independientes.

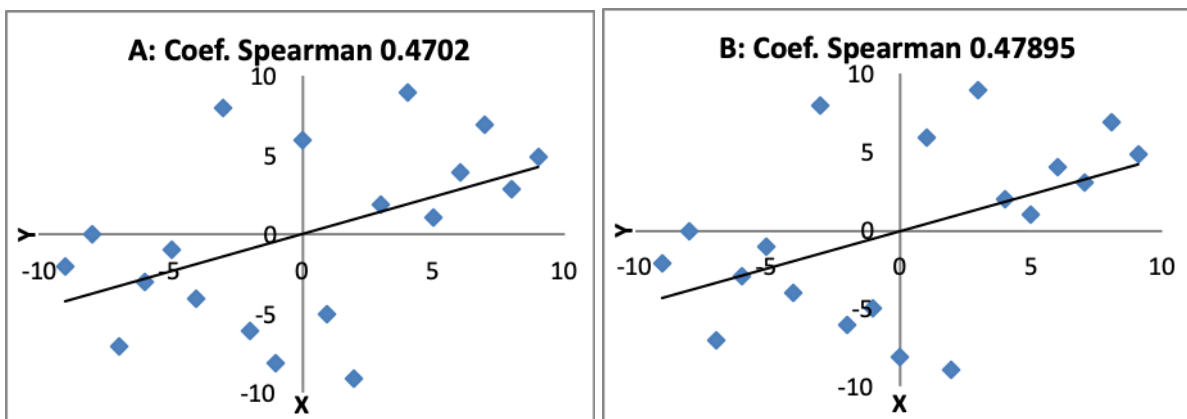


Figura 4. Análisis de correlación de Spearman entre la suma de moléculas de glifosato y AMPA en suelos del sudeste bonaerense respecto a sus coeficientes empíricos K_d (izquierda) y K_f (derecha). X representa el rango los valores de los coeficientes e Y representa el rango los valores de la suma de dichas moléculas reportado según Aparicio *et al.* (2013).

Tabla 4. Datos generados en este estudio y reportes previos de suelos pampeanos utilizados en el análisis de asociación entre la disipación del glifosato en campo y las propiedades del suelo.

| Suelos | Kd * (L kg ⁻¹) | Kf * (L kg ⁻¹) | DPA | CO % | pH | C.I.C. (cmol k ⁻¹) | Textura (%) | | | Glifosato (GP) μMoles kg ⁻¹ | AMPA μMoles kg ⁻¹ | GP+AMPA μMoles kg ⁻¹ | Referencias |
|--------|-------------------------------|-------------------------------|-----|---------|------|-----------------------------------|-------------|-------|---------|--|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| | | | | | | | Arena | Limo | Arcilla | | | | |
| A10 | 172.59 | 233.22 | 44 | 5 | 5.70 | 25.00 | 46.80 | 29.20 | 24.60 | 3.32 | 20.73 | 24.05 | Este estudio |
| A5 | 188.63 | 253.36 | 44 | 4.1 | 5.80 | 27.50 | 40.40 | 33.40 | 26.10 | 0.92 | 12.80 | 13.72 | Este estudio |
| P0 | 277.45 | 366.48 | 44 | 10.60 | 6.10 | 40.4 | 39.50 | 30.50 | 29.20 | 5.37 | 7.51 | 12.88 | Este estudio |
| 1 | 160.98 | 217.25 | 188 | 5.77 | 6.32 | 24.02 | 42.18 | 29.75 | 28.08 | 1.13 | 6.60 | 7.73 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |
| 2 | 194.64 | 261.73 | 94 | 6.45 | 6.17 | 27.95 | 42.78 | 33.26 | 23.96 | 0.83 | 9.47 | 10.31 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |
| 3 | 201.14 | 268.61 | 5 | 6.87 | 5.16 | 29.73 | 35.05 | 36.16 | 28.79 | 2.90 | 7.17 | 10.07 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |
| 4 | 204.80 | 274.64 | 11 | 6.37 | 5.88 | 29.43 | 45.60 | 30.02 | 24.38 | 8.89 | 2.70 | 11.58 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |
| 5 | 171.17 | 232.95 | 1 | 5.02 | 6.35 | 23.87 | 52.51 | 28.01 | 19.48 | 2.54 | 4.86 | 7.40 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |
| 6 | 147.58 | 202.76 | 48 | 3.15 | 7.64 | 20.53 | 56.88 | 23.99 | 19.13 | 1.10 | 8.06 | 9.17 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |
| 7 | 151.28 | 208.30 | 73 | 4.20 | 5.92 | 20.57 | 57.14 | 26.32 | 16.54 | 1.52 | 8.30 | 9.82 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |
| 8 | 210.46 | 283.77 | 10 | 7.57 | 6.03 | 29.11 | 49.28 | 32.44 | 18.27 | 5.24 | 8.63 | 13.88 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |
| 9 | 190.72 | 256.26 | 40 | 5.74 | 5.37 | 27.67 | 40.37 | 34.21 | 25.42 | 0.21 | 4.42 | 4.63 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |
| 10 | 167.30 | 225.58 | 40 | 4.51 | 5.79 | 24.77 | 36.22 | 36.38 | 27.40 | 2.29 | 7.11 | 9.40 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |
| 11 | 187.76 | 251.75 | 4 | 5.40 | 5.89 | 27.68 | 38.31 | 33.92 | 27.76 | 0.47 | 5.24 | 5.71 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |
| 12 | 179.13 | 241.31 | 10 | 5.37 | 5.86 | 26.10 | 49.15 | 25.21 | 25.64 | 1.87 | 4.12 | 6.00 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |
| 13 | 160.45 | 216.12 | 8 | 4.20 | 5.58 | 24.22 | 41.51 | 28.91 | 29.59 | 1.22 | 4.67 | 5.90 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |
| 14 | 189.13 | 251.31 | 8 | 5.92 | 6.08 | 29.19 | 35.58 | 29.41 | 35.01 | 0.22 | 6.55 | 6.77 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |
| 15 | 212.78 | 279.55 | 14 | 5.50 | 6.34 | 33.75 | 21.48 | 36.49 | 42.03 | 6.40 | 4.37 | 10.78 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |
| 16 | 196.39 | 261.47 | 14 | 6.02 | 6.49 | 29.69 | 35.29 | 32.48 | 32.23 | 6.37 | 20.32 | 26.69 | Aparicio <i>et al</i> , 2013 |

Dollinger *et al*, 2015

DPA: días posteriores a la aplicación de GP

CO: carbono orgánico

2.4 Discusión

El GP fue degradado rápidamente en todos los suelos independientemente del historial de uso del herbicida. Este resultado es concordante con lo reportado en la literatura sobre la existencia de varios grupos de microorganismos capaces de usar el GP como fuente de C, N y P (Ermakova *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 1991; Sviridov *et al.*, 2015; Zboinska *et al.*, 1992), y que tanto la tolerancia (Allegrini *et al.*, 2015) como la conversión de GP en AMPA por parte de las bacterias, no necesita una exposición previa al herbicida (Sviridov *et al.*, 2015).

La menor tasa de degradación observada en el suelo sin historial de uso del herbicida (P0), respecto a los suelos con historial (A5 y A10), concuerda con los resultados obtenidos por Araujo *et al.* (2003) quienes encontraron mayor producción de dióxido de carbono al aplicar GP en dos suelos con seis años de historial en comparación con dos sin historial. Al mismo tiempo difieren de lo obtenido por De Andrea *et al.* (2003), quienes observaron una menor biomineralización en suelos con más aplicaciones del herbicida. Sin embargo, en este caso las aplicaciones fueron quincenales en 4 intervalos, situación que no ocurre normalmente en el campo.

En el trabajo de Araujo *et al.* (2003), después de incubar sus suelos durante 32 días no observaron diferencias entre el GP residual hallado en suelos del mismo tipo con historiales de aplicación diferentes. Sin embargo, de los dos tipos de suelos ensayados, aquel que tuvo mayor contenido de arcilla mostró valores de GP residual varias veces mayor que los otros suelos con menos arcilla. Estos resultados también concuerdan con lo observado en este estudio en cuanto a la disipación o grado de degradación del herbicida, en relación con el historial y los valores de la tasa de dispersión del GP respecto a propiedades físico-químicas edáficas como el contenido de arcilla, la CIC y la MO.

La gran diversidad de las comunidades microbianas del suelo posibilita la realización de un

amplio rango de procesos, pero es difícil establecer el papel de las comunidades y de las propiedades físico-químicas edáficas en un sistema complejo que se encuentra en constante actividad. En este capítulo el análisis se centra en las tasas de degradación de GP y las propiedades edáficas y se deja el abordaje de las comunidades bacterianas para el capítulo 3 de esta tesis.

Varios estudios han sugerido que las propiedades físico-químicas de los suelos han determinado más las tasas de degradación del GP que la composición de las comunidades microbianas edáficas (Baker *et al.*, 2010; Vinther *et al.*, 2008). Nuestra observación de que el modelo Michaelis-Menten se convirtió esencialmente en uno de primer orden implica que la K_m es mucho mayor que la tasa de degradación del GP, es decir, existe una baja afinidad general por el GP, lo cual difiere sustancialmente de las observaciones de laboratorio, apuntando a la complejidad de la biodegradación bajo condiciones de campo.

Parámetros como el contenido de materia orgánica y de arcilla han tenido la mayor influencia en el potencial de mineralización del GP relacionado con su adsorción al suelo (Vinther *et al.*, 2008). Suelos con una alta adsorción y baja desorción del GP han mostrado menos degradación biológica, sugiriendo una biodisponibilidad del GP limitada (Sørensen *et al.*, 2006; Okada *et al.*, 2017).

La alta afinidad de suelos de diferentes regiones de Argentina por el GP han sido asociados con altos contenidos de arcilla, Al, Fe, fósforo, bajo pH y alta CIC (Gómez Ortiz *et al.*, 2017; Okada *et al.*, 2016). Estos trabajos fueron realizados en condiciones controladas e incluyeron suelos provenientes de Buenos Aires, La Pampa, Córdoba, Entre Ríos y Misiones. Cuando se estudió el efecto del tipo de manejo sobre la afinidad por el GP, se vio que no determinó cambios en el proceso.

En nuestro trabajo se obtuvo una asociación significativa entre la suma de total de moléculas de GP y AMPA y los valores de K_d y K_f calculados, tanto para los suelos de este estudio

como para otros 16 suelos del sudeste bonaerense.

La identificación de propiedades del suelo que influyen directamente en la adsorción de plaguicidas permiten predecir este proceso a través de funciones de pedotransferencia (Weber *et al.*, 2004; Vinther *et al.*, 2008). Esto es muy importante para comprender el destino de estas sustancias, su disponibilidad para ser biodegradadas y en consecuencia implementar una mejor gestión para limitar la contaminación de diferentes matrices ambientales y potenciar la degradación.

Según las variables incluidas en las funciones de pedotransferencia probadas, podemos inferir que para los suelos en estudio, la capacidad de intercambio catiónico, el contenido de arcilla y el de materia orgánica serían los parámetros más relacionados con la adsorción de GP en estos suelos y con su biodisponibilidad. Estos tres parámetros están vinculados entre sí porque tanto el contenido de arcilla como el porcentaje de MO influyen la CIC (Cremers y Laudelout, 1966). Sin embargo, de manera individual no fueron correlacionados significativamente con las concentraciones ambientales de GP y AMPA en el suelo.

Sería interesante determinar en el futuro si estas pedofunciones, que son de utilidad para estimar el grado de persistencia de ambos compuestos en los suelos de la región pampeana del sudeste bonaerense, pueden ser extendidas al resto del territorio agrícola argentino. En el mismo sentido, estas funciones podrían ser comparadas con la función propuesta por De Gerónimo *et al.* (2018) y establecer el alcance de cada una. En tal sentido, esta última función (De Gerónimo *et al.*, 2018) incorpora en la ecuación el pH con un peso importante, variable que no difirió significativamente entre los suelos analizados en ese estudio. Además incluye en la fórmula el contenido de aluminio, parámetro que no es determinado comúnmente en los análisis de suelo.

Es importante mencionar a pesar que el GP se disipó rápidamente en los suelos estudiados, las concentraciones de AMPA se mantuvieron altas durante la duración de este ensayo. Al

igual que el GP, la formación del AMPA y su disipación son dependientes de la actividad microbiana, siendo la temperatura y la humedad edáficas los factores que mayormente afectan estos procesos (Bento *et al.*, 2016). EL AMPA persiste por períodos más largos en el suelo cuando las temperaturas son bajas y se disipa más lento que el GP bajo las mismas condiciones (Bento *et al.*, 2016). Estos antecedentes y los reportes de las concentraciones ambientales de AMPA reportadas para diferentes suelos argentinos, abren nuevas interrogantes sobre el grado de persistencia de este compuesto en la zona y los factores que lo determinan.

Partiendo del hecho que el grado de exposición previa del suelo al GP tuvo poco efecto en la cinética de biodegradación y que se obtuvo una asociación significativa entre el GP residual y los estimadores del grado de adsorción del GP al suelo, podemos concluir que la biodisponibilidad fue un factor determinante que afectó el grado de agotamiento total del GP en el suelo. El estudio de las comunidades bacterianas, detallado en el próximo capítulo, permitió analizar su grado de influencia en el proceso.

Capítulo 3. Dinámica de corto plazo de las comunidades bacterianas en función de la degradación del glifosato

3.1 Introducción

3.1.1 Microorganismos tolerantes y degradadores de glifosato

La capacidad de diferentes microorganismos del suelo para degradar GP, tanto por la vía del AMPA como de la sarcosina, e independientemente de su grado de exposición previo al compuesto, ha sido evaluada en condiciones de laboratorio (Sviridov *et al.*, 2015). Es así que en la literatura se han reportado representantes de diferentes taxones bacterianos como los pertenecientes al filo Proteobacteria: Alfaproteobacteria [*Rhizobium meliloti* 1021 (Liu *et al.*, 1991), *Ochrobactrum anthropi* GDOS (Hadi *et al.*, 2013)], Betaproteobacteria [*Achromobacter* sp. (Sviridov *et al.*, 2012)] y Gammaproteobacteria [*Pseudomonas* sp. PG2982 (Moore *et al.*, 1983), *P. pseudomallei* 22 (Penaloza-Vasquez *et al.*, 1994), *Enterobacter cloacae* K7 (Krychkova *et al.*, 2014) y *Chromohalobacter marismortui* (Hayes *et al.*, 2000)], al filo Actinobacteria: [*Arthrobacter* sp GLP-1 (Pipke *et al.*, 1988) y *Streptomyces* sp (Obojska *et al.*, 1999)], al filo Bacteroidetes: [*Flavobacterium* sp GD1 (Balthazor y Hallas, 1986)] y al filo Firmicutes [*Geobacillus caldoxylosilyticus* T20 (Obojska *et al.*, 2002)]. También se han reportado diferentes hongos: *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp, *Scopulariopsis* sp. y *Trichoderma harzianum* (Krzysko-Lupicka *et al.*, 1997) y una especie de levadura *Kluyveromyces fragilis* (Ternana y McMullan, 2000).

En Argentina, el conocimiento sobre los microorganismos del suelo que contribuyen a la degradación del GP en diferentes ambientes no ha sido abordado exhaustivamente. Al respecto, existen reportes de una cepa de *Bradyrhizobium* sp. tolerante al herbicida, cepas degradadoras de *Pseudomonas* sp. aisladas de suelos con sistemas de labranzas orgánico y convencional (Zabaloy y Gómez, 2005; Rörig, 2012) y Enterobacterias provenientes de suelos agrícolas y prístinos con potencialidades para degradar GP (Hernández *et al.*, 2018).

El estudio de las poblaciones degradadoras del herbicida como una función importante en el mantenimiento de la salud del suelo ha sido abordado escasamente y, en nuestro conocimiento, no existen trabajos en condiciones de campo que lo describan. Generalmente, las comunidades microbianas tienen mayor potencial para degradar el GP comparado con las cepas individuales (Zhan *et al.*, 2018), por lo que la búsqueda de un grupo de microorganismos que degraden colectivamente al GP y sus residuos podría ser una estrategia adecuada para lograr una degradación más efectiva a campo.

La mayoría de los trabajos que aparecen en la bibliografía hacen referencia al impacto de la aplicación de GP sobre la composición, diversidad y actividad de las poblaciones microbianas del suelo y se focalizan en grupos con funciones importantes en el mantenimiento del suelo. Gran parte de estos se realizaron en microcosmos, obteniéndose una gran variedad de respuestas que abarcan efectos temporales a permanentes. Se ha reportado tanto la reducción como el aumento de la actividad y la biomasa microbianas en el suelo (Gómez *et al.*, 2009; Haney *et al.*, 2002) y la afectación de diversos grupos como por ejemplo, la disminución de la abundancia relativa de miembros del filo Acidobacteria (Newman *et al.*, 2016a), la disminución del número y la diversidad de bacterias fijadoras del nitrógeno, acentuada luego de aplicaciones repetidas (Allegrini *et al.*, 2017) y la disminución de la colonización de micorrizas aún en concentraciones bajas del herbicida (Druille *et al.*, 2013).

En las últimas décadas, además de los métodos convencionales de estudio de las comunidades microbianas dependientes del cultivo, se han incorporado técnicas independientes del cultivo, sustentadas en el ADN y otras moléculas, que han permitido determinar el impacto de la aplicación de plaguicidas sobre las poblaciones microbianas del suelo. Entre estas técnicas se encuentran la electroforesis en gradiente desnaturizante (DGGE), los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (T-RFLP), el análisis de ácidos grasos fosfolípidos (PLFA) y las técnicas de secuenciación masiva de nueva

generación (NGS) (Muyzer *et al.*, 1993; Newman *et al.*, 2016 b; Schütte *et al.*, 2008; Widenfalk *et al.*, 2008).

Las técnicas de NGS posibilitan el estudio con alta resolución de la diversidad y dinámica de las comunidades microbianas de ecosistemas complejos como el suelo. Los análisis basados en la secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S son herramientas rápidas y muy informativas, teniendo en cuenta que este marcador está altamente conservado entre las especies procariotas por ser más resistente a mutaciones. En tal sentido, se han realizado investigaciones sobre comunidades microbianas respondiendo a la aplicación de GP en las rizosferas de plantas de maíz y soja (Newman *et al.*, 2016 a).

3.1.2 Variaciones de la actividad microbiana ante la aplicación de glifosato

La actividad de las comunidades microbianas ante aplicaciones repetidas de GP ha sido evaluada de manera general. Araújo *et al.* (2003) encontraron un incremento en la respiración y en la actividad de hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) en suelos agrícolas con historial de uso del GP, comparados con suelos que no tuvieron exposiciones previas al producto. De Andrea *et al.* (2003) hallaron que múltiples aplicaciones del herbicida redujeron la respiración microbiana, aumentando el tiempo de vida media del herbicida, en relación con una sola aplicación. En Argentina, Gómez *et al.* (2009) reportaron un aumento inicial de la actividad deshidrogenasa seguido de una disminución de la biomasa microbiana a diferentes dosis de GP. Zabaloy *et al.* (2012) detectaron una tasa de respiración aumentada en suelos prístinos y no así en suelos agrícolas expuestos al herbicida. Estos resultados sugieren que la aplicación repetida del GP afecta la composición y/o la actividad de las comunidades microbianas del suelo. Sin embargo, Allegrini *et al.* (2015) no encontraron diferencias en la tolerancia de comunidades microbianas al glifosato a partir de suelos contrastantes con y sin historial de uso del herbicida.

Se ha reportado que las comunidades bacterianas están determinadas fuertemente por el tipo de suelo más que por su manejo (Girvan *et al.*, 2003). Sin embargo, en cuanto al GP, se ha encontrado que las tasas de mineralización son mayores en suelos con manejo orgánico en comparación con los convencionales (Gimsing *et al.*, 2004). Por otro lado, las prácticas de manejo modifican en el mediano y largo plazos las propiedades de los suelos, influenciando sus procesos. Según nuestros resultados, mostrados en el capítulo anterior, no se evidenciaron diferencias en el grado de degradación del GP de los suelos con historial de aplicación del herbicida y características de uso contrastantes, pero si en las tasas de disipación que relacionamos con las propiedades edáficas. Para evaluar si estos resultados se relacionan con la biodisponibilidad del GP y/o con las comunidades microbianas, se propusieron como objetivos del siguiente capítulo: determinar la dinámica de las poblaciones bacterianas ante la aplicación del GP y caracterizar su composición en suelos con diferentes historiales de aplicación del GP y características de uso, estableciendo relaciones con las características edáficas.

Para ello pusimos a prueba las siguientes hipótesis:

- La composición de las poblaciones bacterianas de suelos con diferente uso está más influenciada por las propiedades edáficas que por el grado de exposición previa al herbicida.
- La abundancia de grupos bacterianos relacionados con la degradación del GP aumentan después de su aplicación.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Extracción de ADN y secuenciación

Las extracciones de ADN se realizaron a partir de 0.25 gramos de suelo, procesadas tal como se indica el capítulo 2 y correspondiente a las muestras colectadas los días 0, 1, 8, 16 y 32 días, utilizando el kit DNA PowerSoil (MoBio, EUA) según las instrucciones del fabricante. Se realizó la amplificación de un fragmento de la región hipervariable V3-V5 del gen ARN ribosomal 16S (~ 640 pb) mediante PCR. Los cebadores utilizados fueron: 357-directo 5'CACGACGTTGTAACGACCCTACGGGAGGCAGCAG 3' y 926-reverso 5'CAGGAAACAGCTATGACCCCGTCAATTCMTTTRAGT 3' (Lane, 1991).

Las PCR se realizaron en un volumen final de 30 µL, conteniendo 1 U de la Polimerasa Phusion®High Fidelity y Buffer 1X (NEB, EUA), 0.2 mM de dNTPs y 0.03 µM de cada cebador. El programa consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min. seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 20 seg., hibridación a 51 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min. El paso final consistió de una extensión a 72 °C por 5 min. Para la secuenciación de cada muestra se usó un “*pool*” de tres reacciones de PCR, cuyo producto fue previamente visualizado en un gel de agarosa 1 % (TBE 1X) y purificado usando el kit “Nucleospin® DNA, RNA and protein purification” (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Los amplicones purificados sirvieron de templado para una segunda reacción de PCR que añadió cebadores con adaptadores para la secuenciación 454 y cebadores MID (Multiplex Identifiers): identificadores de multiplexado. La reacción de secuencia consistió en un paso inicial de 95 °C durante 5 min., seguido de 20 ciclos 95 °C por 30 seg. y 72 °C por 1 min, terminando con un paso de extensión final a 72 °C durante 5 min. Los amplicones fueron purificados y cuantificados para ajustar sus concentraciones. El ADN fue secuenciado en una placa de una plataforma 454/Roche GS FLX Titanium en el INDEAR, Rosario, Argentina.

3.2.2 Procesamiento de los datos de secuenciación

Los datos fueron procesados usando QIIME 1.9.0 (“Quantitative Insights Into Microbial Ecology”) siguiendo los procedimientos para datos de secuencias 454 (Caporaso *et al.*, 2010). El procesamiento de las secuencias generadas consistió en un primer paso de decodificación de la información, basada en la asignación de las lecturas pertenecientes a cada muestra y el filtro por calidad y la eliminación de quimeras. Posteriormente se realizó el agrupamiento de secuencias en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) por similitud de secuencias, y la asignación taxonómica mediante alineamiento de secuencias respecto a una base de datos de referencia, generándose las tablas de OTUs usadas en los posteriores análisis de las comunidades bacterianas.

Brevemente, las secuencias fueron “demultiplexadas” (decodificadas) a partir de las secuencias crudas generadas por el secuenciador, en formato FASTA, sus respectivos reportes de calidad y el archivo de mapeo validado. Se le asignó a cada lectura el código de barras correspondiente a la muestra de la que provenía, se filtró por calidad basados en longitudes de lectura mayores de 220 pb, un máximo de 2 errores de lectura en las secuencias de código de barras/identificadoras (barcodes) y hasta 2 errores en la lectura de los cebadores. Se removieron las secuencias con baja calidad o lecturas ambiguas y se removió el cebador “reverse”. La identificación de secuencias quiméricas se realizó usando el algoritmo ChimeraSlayer.

El flujo de trabajo para detección de las OTUs “pickotus” consistió en la asignación de OTUs a secuencias similares agrupadas por un umbral de similitud de 0,97 (método Uclust) y la posterior selección de secuencias representantes por OTU, determinadas por el criterio de mayor abundancia dentro del grupo, y la asignación de taxonomía por alineamiento de secuencias (método PyNAST), utilizando la base de datos bacteriana SILVA como referencia (disponible en: https://www.arb-silva.de/no_cache/download/archive/release_123).

Estos datos fueron usados para elaborar una tabla de OTUs, indicando el número de veces que una OTU determinada apareció en cada muestra. Para los análisis posteriores, el número de secuencias fue normalizado a 3173 lecturas por muestra, mediante submuestreos al azar. Las OTUs que aparecieron en menos del 25 % del número total de muestras para cada sitio fueron removidas. Estas tablas de OTUs rarefaccionadas fueron usadas para calcular las métricas de diversidad alfa, que incluyeron: índice de Shannon (Ludwig y Reynolds, 1988), OTUs observados, Chao 1 (Chao, 1984) y dominancia. También se estimaron las métricas filogenéticas de diversidad beta usando “weighted UniFrac” y “unweighted UniFrac” (Hamady *et al.*, 2010).

La cantidad de OTUs compartidas entre los diferentes sitios se visualizó mediante un diagrama de Venn, usando el paquete *gplots* en el lenguaje R 2.10.1 (R Core Team, 2017). Todas las secuencias fueron depositadas en la base de datos de NCBI: Sequence Read Archive (SRA) y se encuentran disponibles bajo el número de acceso PRJNA393173.

3.2.3. Análisis estadístico de la estructura de las comunidades bacterianas

Para determinar la interdependencia entre especies microbianas en el tiempo, asociada a la aplicación de GP en los tres sitios, los datos fueron analizados usando el test no paramétrico de interdependencias microbianas mediante estructura de datos *phyloseq* (Nonparametric Microbial Interdependence Test: NMIT-Phyloseq) (Zhang *et al.*, 2017). Brevemente este análisis consistió, primeramente, en calcular una matriz de correlación de interdependencias basadas en las medidas repetidas en el tiempo del número de secuencias para cada OTU, por parcela experimental (repetición) y por tratamiento, para cada sitio. Como segundo paso se calculó la matriz de distancia entre las diferentes OTUs y se compararon las distancias entre todas las OTUs dentro de una misma parcela, luego entre las 3 parcelas dentro de cada tratamiento y por último entre tratamientos. Las diferencias estadísticas entre estructuras correlacionadas, asociadas al tratamiento con GP, fueron determinadas por permutación

MANOVA. Los taxones con abundancias relativas mayores del 0.3% y presentes en el 20% de las muestras, para cada parcela experimental y para cada tratamiento en los 3 sitios, fueron incluidos en el análisis de correlación (Kendall rank correlation). Las correlaciones mayores a 0.8 entre los taxones bacterianos, tanto positivas como negativas, en al menos dos de las tres parcelas sometidas al mismo tratamiento, se graficaron usando el paquete CIRCOS (Krzywinski *et al.*, 2009).

Se determinaron las diferencias estadísticamente significativas entre las abundancias de taxones para cada tratamiento: aplicado con GP y control, en cada sitio, usando el análisis permutacional multivariado de varianza Adonis con 999 permutaciones (paquete Vegan - Lenguaje R).

Las métricas de diversidad alfa entre los tratamientos control y el aplicado con GP para cada sitio, se compararon usando el *script* o comando: *compare_alpha_diversity.py* del QIIME. Además, las variaciones en el tiempo de estas métricas de diversidad alfa fueron analizadas mediante modelos mixtos lineales usando el procedimiento PROC MIXED (SAS Institute version 9.0, 2002). Las diferencias entre las abundancias relativas de los principales taxones por tratamiento, en el tiempo, también fueron evaluadas por este procedimiento. El tratamiento fue considerado como efecto fijo, el sitio como efecto aleatorio y la medida repetida fue el tiempo, entendido como los diferentes momentos de muestreo.

Las distancias Weighted UniFrac entre los tratamientos para cada sitio fueron comparadas por el método ANOSIM, con 999 permutaciones (paquete Vegan - Lenguaje R) El análisis de coordenadas principales (PCoA) se realizó usando el *script* o comando de QIIME: *beta_diversity_through_plots.py*. Para identificar correlaciones significativas entre la composición de las comunidades bacterianas y las propiedades de los suelos se empleó el test de Mantel.

3.3 Resultados

La composición de las comunidades bacterianas se determinó mediante secuenciación de alto rendimiento de los amplicones del gen ARNr 16S. Se obtuvieron un total de 399,466 secuencias de alta calidad después del procesamiento inicial. Posterior a la exclusión de las secuencias que no se pudieron agrupar o de aquellas únicas (“singletons”), se obtuvo un promedio de 114,004 secuencias por cada sitio.

Los análisis de diversidad alfa a través del tiempo revelaron diferencias transitorias. Para todos los suelos, las métricas OTUs observadas, riqueza Chao 1 y diversidad Shannon aumentaron temporalmente después de la aplicación de GP hasta el día 16, recuperando las condiciones iniciales hacia el día 32 que fue la última determinación para este estudio (Tabla 5). Los valores para el índice dominancia también mostraron un ligero incremento. Sin embargo, los cambios observados en las comunidades bacterianas no pudieron atribuirse a la exposición al herbicida, porque cambios similares fueron observados en las parcelas control que no recibieron aplicación de GP (Tabla 5).

Tabla 5. Dinámica de las métricas de diversidad alfa en los tres suelos estudiados. Los valores representan los valores de la media \pm error estándar

| Suelos | DPA | Dominancia | | OTUs Obsevados | | Riqueza Chao1 | | Índice de Shannon | |
|--------|-----|------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | | GP | Control | GP | Control | GP | Control | GP | Control |
| A10 | 1 | 0.0029 \pm 0.0002 bA | 0.0031 \pm 0.0001 aB | 1451 \pm 218 cA | 1401 \pm 213 bB | 3358 \pm 95 bA | 3389 \pm 91 bA | 9.67 \pm 0.04 cA | 9.58 \pm 0.04 bB |
| | 8 | 0.0024 \pm 0.0002 aA | 0.0037 \pm 0.0002 bB | 1332 \pm 234 aA | 1334 \pm 213 aA | 2952 \pm 106 aA | 3159 \pm 91 aB | 9.58 \pm 0.05 bA | 9.42 \pm 0.04 aB |
| | 16 | 0.0025 \pm 0.0002 aA | 0.0037 \pm 0.0002 bB | 1479 \pm 213 dA | 1439 \pm 218 cB | 3525 \pm 91 cA | 3479 \pm 95 bcA | 9.75 \pm 0.04 dA | 9.61 \pm 0.04 bB |
| | 32 | 0.0031 \pm 0.0002 cA | 0.0037 \pm 0.0001 bB | 1350 \pm 213 bA | 1409 \pm 213 bB | 3251 \pm 91 bA | 3302 \pm 91 bA | 9.52 \pm 0.04 aA | 9.66 \pm 0.04 cB |
| A5 | 1 | 0.0023 \pm 0.0001 aA | 0.0025 \pm 0.0001 aB | 1515 \pm 213 bA | 1535 \pm 213 cB | 3785 \pm 91 bA | 4005 \pm 91 cB | 9.83 \pm 0.04 cA | 9.82 \pm 0.04 cA |
| | 8 | 0.0024 \pm 0.0002 aA | 0.0027 \pm 0.0002 bB | 1516 \pm 218 bcA | 1427 \pm 233 aB | 3788 \pm 95 bA | 3335 \pm 106 aB | 9.81 \pm 0.04 bcA | 9.65 \pm 0.04 bB |
| | 16 | 0.0027 \pm 0.0001 bA | 0.0029 \pm 0.0001 cB | 1534 \pm 213 cA | 1480 \pm 213 bB | 4114 \pm 91 cA | 3988 \pm 91 cB * | 9.78 \pm 0.04 bA | 9.68 \pm 0.04 bB |
| | 32 | 0.0032 \pm 0.0001 cA | 0.0031 \pm 0.0001 dA | 1420 \pm 213 aA | 1405 \pm 213 aA | 3596 \pm 91 aA | 3488 \pm 91 bB * | 9.60 \pm 0.04 aA | 9.58 \pm 0.04 aA |
| P0 | 1 | 0.0032 \pm 0.0002 aA | 0.0032 \pm 0.0002 aA | 1280 \pm 218 bA | 1276 \pm 213 cA | 2888 \pm 95 aA | 2924 \pm 91 bA | 9.43 \pm 0.04 bA | 9.42 \pm 0.04 cA |
| | 8 | 0.0031 \pm 0.0002 aA | 0.0032 \pm 0.0002 aA | 1292 \pm 218 bA | 1246 \pm 218 bB | 3033 \pm 95 bA | 2735 \pm 95 aB | 9.44 \pm 0.04 bA | 9.37 \pm 0.04 bB |
| | 16 | 0.0034 \pm 0.0001 bA | 0.0032 \pm 0.0002 aB * | 1317 \pm 213 cA | 1243 \pm 218 bB | 2983 \pm 91 abA | 2825 \pm 95 abB | 9.46 \pm 0.04 bA | 9.36 \pm 0.04 bB |
| | 32 | 0.0034 \pm 0.0001 bA | 0.0035 \pm 0.0002 bB | 1251 \pm 213 aA | 1212 \pm 213 aB | 2941 \pm 91 abA | 2775 \pm 91 aB | 9.34 \pm 0.04 aA | 9.27 \pm 0.04 aB |

DPA: días posteriores a la aplicación.

Letras minúsculas indican diferencias significativas a través del tiempo para el mismo tratamiento; Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para el mismo tiempo ($p < 0.01$); (*) indica diferencias significativas entre tratamientos para el mismo tiempo ($p < 0.05$).

En forma consistente con el hecho de que los sitios de estudio se encontraban cercanos entre sí, todas las muestras compartieron un gran número de OTUs (Figura 5). Las OTUs que solo aparecían en un sitio, por ejemplo en el prístino pero no en los agrícolas, y viceversa, representaron un grupo heterogéneo de secuencias que tuvieron una baja representatividad dentro de cada comunidad.

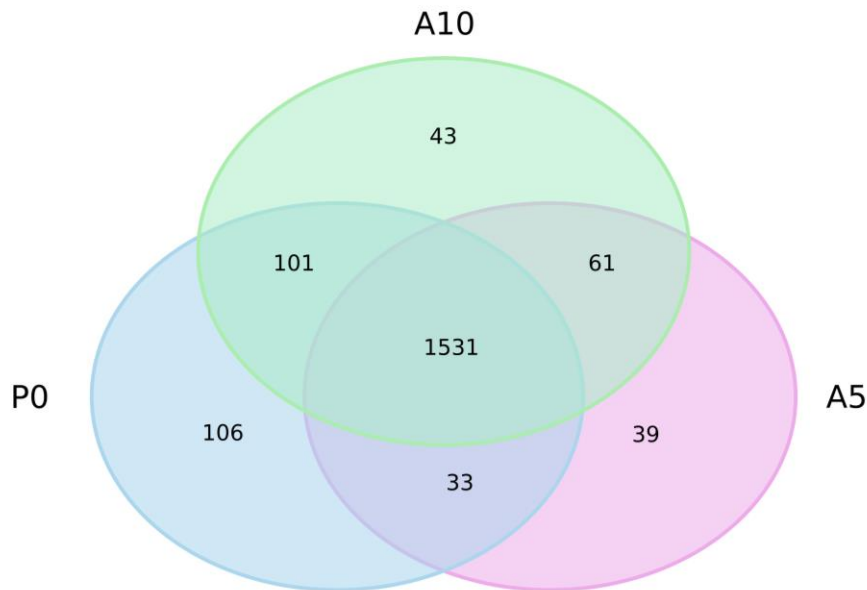


Figura 5. Representación en diagrama de Venn de las OTUs identificadas en los tres suelos estudiados: A10, A5 y P0. El número de secuencias superpuestas y específicas de cada sitio son indicadas en el gráfico.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) indicó que las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas eran más similares entre sí y más distantes de aquellas del suelo no agrícola (Figura 6). La primera coordenada principal del análisis PCoA explicó casi el 19% de la variabilidad total.

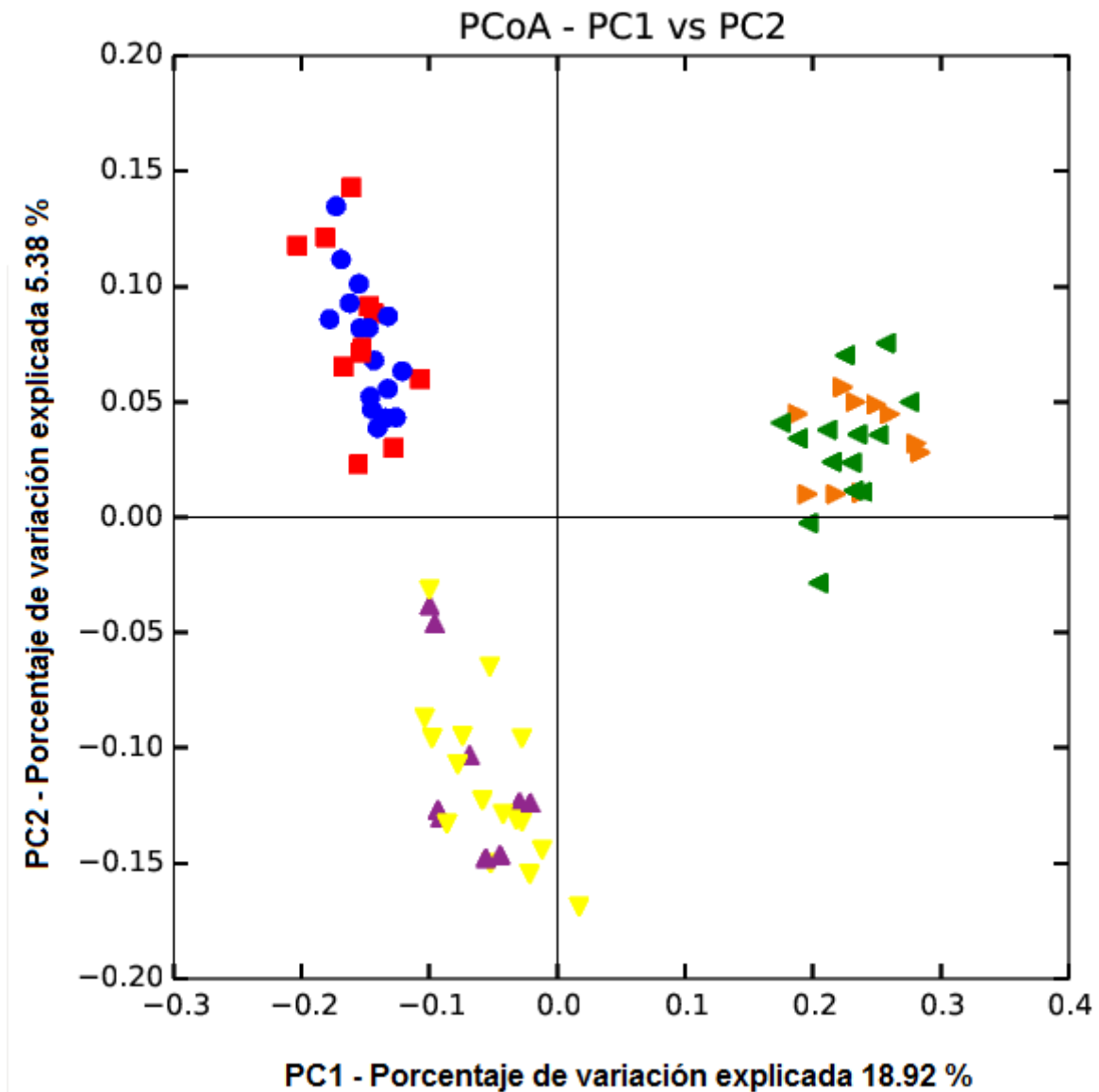


Figura 6. Gráfico de análisis de coordenadas principales (PCoA) que muestra el agrupamiento de las comunidades bacterianas por sitios (A10, A5 y P0) y tratamientos (control: C; aplicado: GP), basados en las matrices de distancias “weighted UniFrac” generadas. Los porcentajes de variación explicados por las coordenadas principales graficadas son indicados en los ejes. Cada punto corresponde a una muestra: ▲ A10_GP; ▼ A10_C; ■ A5_GP; ● A5_C; ► P0_GP; ◄ P0_C.

La composición de las comunidades microbianas correlacionó significativamente con las siguientes propiedades del suelo: contenido de materia orgánica, CIC, pH y contenido de arcilla (Tabla 6).

Tabla 6. Correlaciones (r) y significancias (P) entre la composición de las comunidades bacterianas y las propiedades físico-químicas del suelo, determinadas mediante el test Mantel.

| Propiedades del suelo | R | P |
|-----------------------|--------|--------------|
| MO % | 0.8486 | 0.001 |
| pH | 0.4155 | 0.001 |
| CIC | 0.6859 | 0.001 |
| P-Bray | 0.0914 | 0.014 |
| Arena | 0.1137 | 0.008 |
| Limo | 0.0341 | 0.244 |
| Arcilla | 0.3979 | 0.001 |

Los filos más abundantes fueron Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria y Bacteroidetes (Figura 7). Las diferencias de los perfiles de interdependencias microbianas, determinadas por el test NMIT no fueron estadísticamente significativas entre el control y los suelos aplicados con GP en todos los sitios (P0: $p = 0.4$; A5: $p = 0.7$ and A10: $p=0.3$). Sin embargo, se detectaron pequeños cambios en las abundancias relativas de filos individuales, que fueron mantenidos en el tiempo, especialmente en el suelo P0.

Se observó una disminución en la abundancia de Actinobacteria después de la aplicación de GP en P0 ($p = 0.0428$) y un aumento en la abundancia de Bacteroidetes ($p = 0.0261$), que se notó desde el día 16 en adelante, hasta el día 32. Dentro de este filo, las familias *Flammeovirgaceae* y *Saprospiraceae* (orden *Sphingobacteriales*) aumentaron seguidamente al tratamiento con GP de un 16 % a un 20,3 % y de un 4 % a un 8,5 %, respectivamente. Otros cambios significativos en la abundancia de otros filos no fueron detectados.

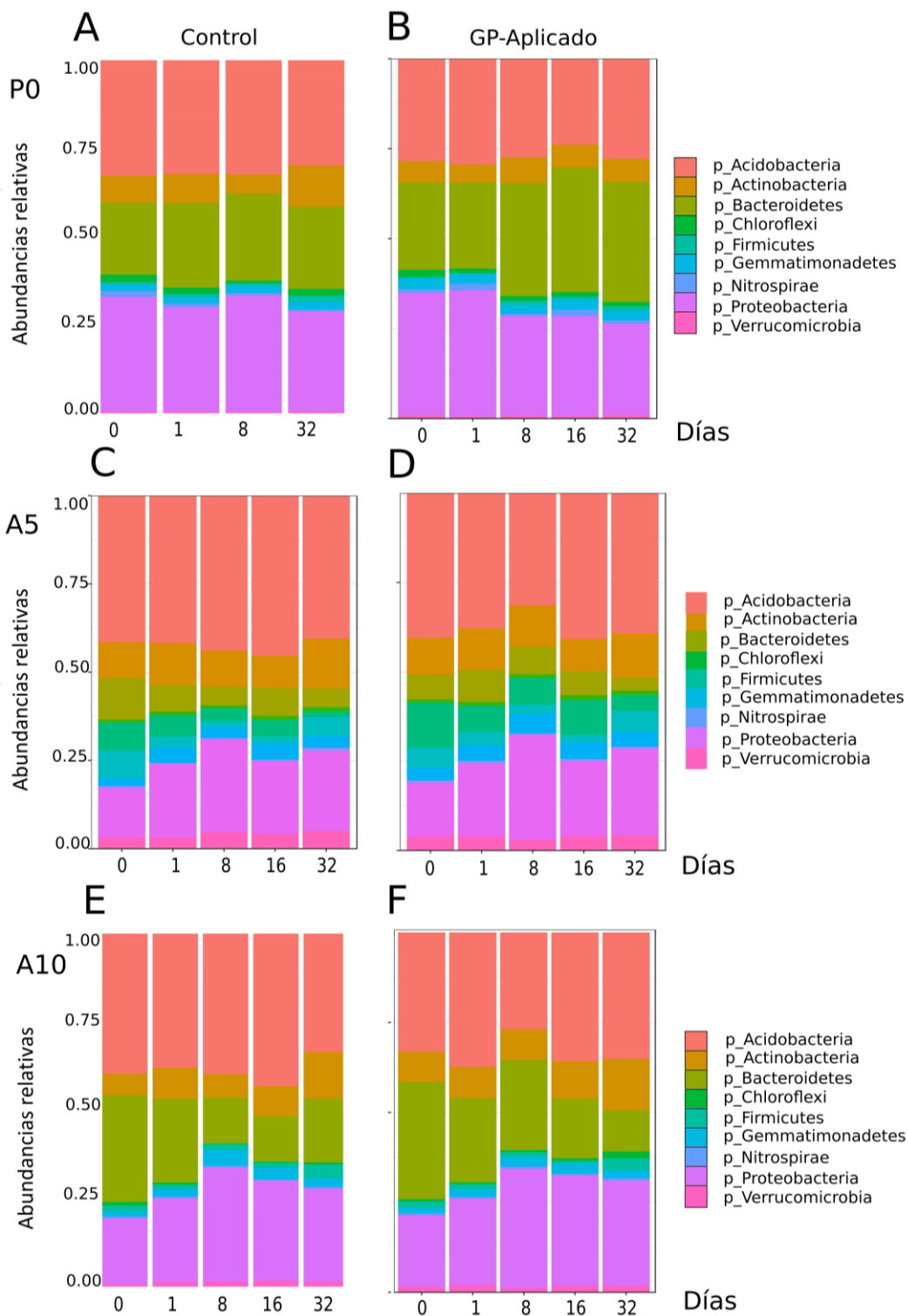


Figura 7. Abundancias relativas de los principales filos, a través del tiempo, detectadas en los suelos control (izquierda: A, C y E) y aplicados con glifosato (derecha: B, D y F) en los tres suelos estudiados: Suelos P0 (A y B), A5 (C y D) y A10 (E y F). El eje X muestra el tiempo a las que fueron tomadas las muestras y el eje Y muestra las medias de las abundancias a través del tiempo, por tratamiento (n=3).

La Figura 8 muestra que los grupos control tuvieron una estructura interdependiente mayor en comparación con los suelos aplicados con GP, lo cual indica que el tratamiento con GP perturba la red de asociaciones bacterianas en el suelo. Los cambios fueron más evidentes en el suelo P0, donde la compleja red visualizada en el tratamiento control disminuyó drásticamente ante la aplicación del GP. Una pérdida similar de interacciones se observó en A5, mientras que en A10 la asociación inicial, que fue más débil que en los casos anteriores, no fue afectada por el uso del herbicida.

En los suelos A5 y P0 el número de interacciones totales disminuyó con la aplicación del GP, mientras que en A10 aumentaron; sin embargo, el número de interacciones positivas se favoreció en dicha condición para todos los suelos (Tabla 7).

Tabla 7. Número de interacciones entre los grupos bacterianos mayoritarios en los tres sitios ante la aplicación de glifosato para $R > 0.6$ y $R > 0.8$.

| Suelos | Tratamientos | Correlaciones | Correlaciones | Correlaciones | Correlaciones |
|--------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | Positivas >0.6 | Negativas >0.6 | Positivas >0.8 | Negativas >0.8 |
| P0 | control | 297 | 295 | 230 | 226 |
| | GP-aplicado | 154 | 129 | 23 | 21 |
| A5 | control | 90 | 101 | 22 | 18 |
| | GP-aplicado | 52 | 29 | 12 | 2 |
| A10 | control | 64 | 66 | 15 | 22 |
| | GP-aplicado | 146 | 121 | 45 | 32 |

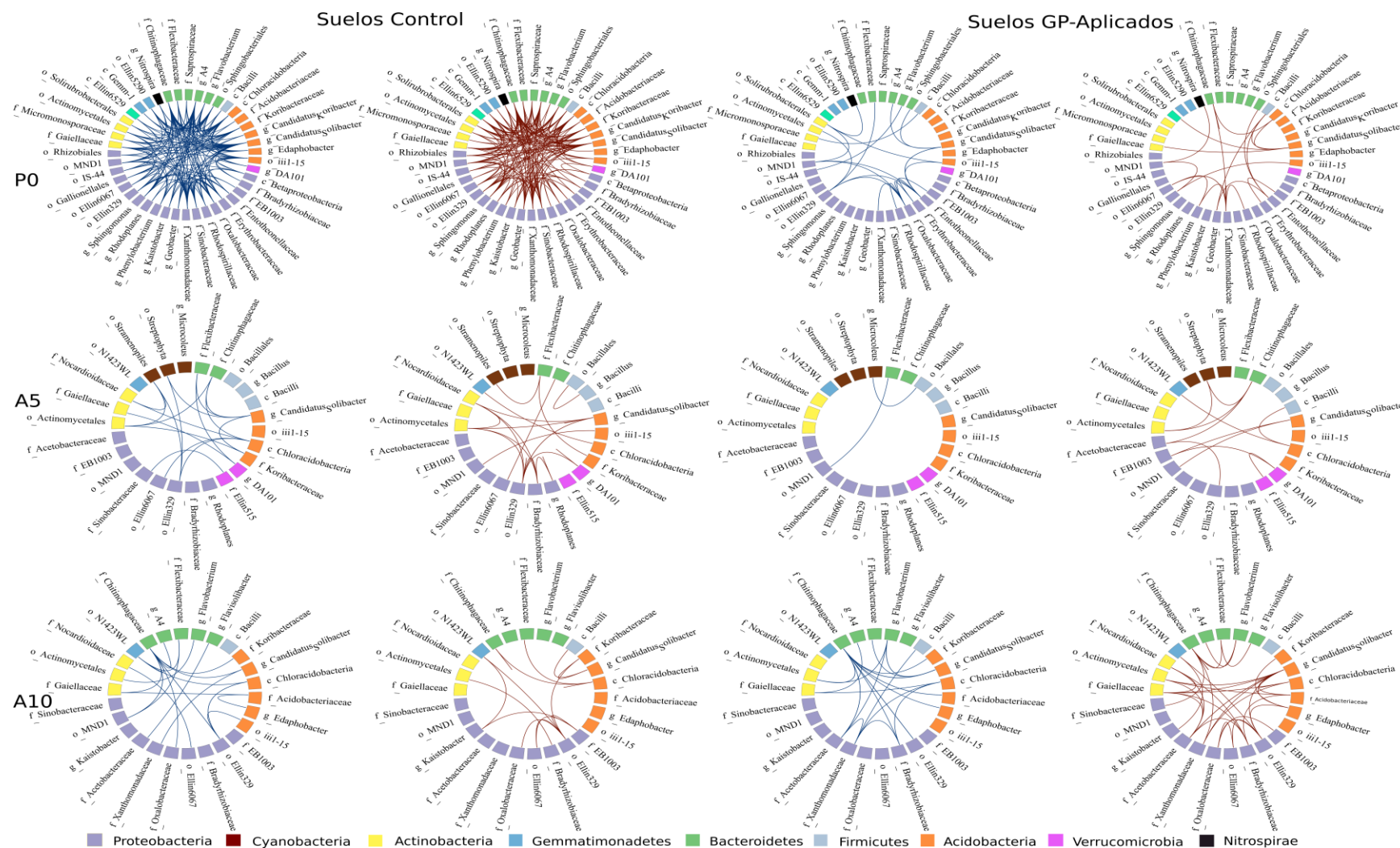


Figura 8. Red de interdependencias de los principales filos microbianos. Los gráficos aparecen separados por tratamientos: suelos control (paneles izquierdos) y suelos aplicados con GP (paneles derechos). Los nodos han sido coloreados según su identificación al nivel taxonómico de filo (parte baja de la figura). Los puentes marcados con líneas indican una correlación entre los filos conectados mayor que 0,8 en al menos 2 de las 3 parcelas por cada tratamiento. Líneas rojas representan correlaciones positivas y líneas azules, correlaciones negativas.

3.4 Discusión

El análisis de la diversidad de las comunidades bacterianas del suelo en los tres sitios con diferente historial de aplicación reveló que existe una separación entre las poblaciones según el tipo de uso del suelo. Las poblaciones bacterianas presentes en los suelos agrícolas fueron más similares entre sí y menos similares en comparación con las del suelo no agrícola. Las diferencias en la estructura de estas poblaciones estuvieron fuertemente correlacionadas con el contenido de MO, la CIC, el pH y el contenido de arcilla. Los tres suelos pertenecen a la misma serie de suelos y se encuentran muy próximos entre sí, lo que presupone un origen común y características originales similares. Sin embargo, sus características edáficas han sido modificadas como resultado del tipo de uso del suelo. Las prácticas de manejo agrícolas, como fertilización, rotación de cultivos y aplicación de plaguicidas, influyen en la diversidad de las comunidades microbianas (Berg y Smalla, 2009; Girvan *et al.*, 2003; Lauber *et al.*, 2008). Paralelamente, el tipo de uso del suelo también provoca efectos a largo plazo en las propiedades físico-químicas de los suelos, especialmente disminuyendo los contenidos de materia orgánica y modificando el pH del suelo (Galantini y Rosell, 2006; Sainz Rozas *et al.*, 2011). Estos parámetros son a su vez moduladores importantes de cambios en la composición de las comunidades microbianas (Zhao *et al.*, 2016).

Las observaciones de este trabajo coinciden con otros estudios recientes, en los que se encontró que las comunidades bacterianas estaban influenciadas más por la ubicación de la muestra, el momento de su toma y el historial de cultivos del suelo, que por el tratamiento con GP en sí (Kepler *et al.*, 2018; Schlatter *et al.*, 2017).

En este estudio no se encontraron cambios en la abundancia relativa de ningún taxón específico que pudiera ser asociado inequívocamente con la disipación del GP en campo. Sin embargo, los cambios observados en Bacteroidetes coincidieron con la disminución de la

concentración de GP en el suelo P0 a partir del día 8 en adelante, sugiriendo una respuesta diferencial de miembros de este filo al tratamiento con el herbicida, ya sea asociada directamente a la degradación de ésta molécula, como indirectamente, producto del cambio en el metabolismo de las comunidades bacterianas del medio producidas por el GP, reportados con anterioridad (Newman *et al.*, 2016b). En los suelos agrícolas esto no fue observado, lo que nos induce a pensar que los cambios observados para este taxón estuvieron influenciados por las características edáficas inherentes a P0.

El aumento de la abundancia relativa de Bacteroidetes, en particular dentro de las familias *Flammeovirgaceae* y *Saprospiraceae*, fue detectado en el suelo sin historial previo de uso del producto (P0). Los miembros de Bacteroidetes están generalmente asociados con la degradación de materiales orgánicos complejos y han sido reportados como copiótrofos que proliferan en condiciones de alta disponibilidad de nutrientes (Fierer *et al.*, 2012). El incremento de copiótrofos ha sido previamente observado cuando se adicionan compuestos orgánicos al suelo, como una estrategia de fertilización, para mejorar el carbono orgánico (Fernández *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). Debido a que en este experimento se aplicó GP comercial que contiene 48 % (p/v) del herbicida, no puede descartarse que otros componentes del producto estén influenciando también sobre las comunidades bacterianas del suelo.

Variaciones sustanciales en las abundancias relativas de Proteobacterias y Bacteroidetes fueron también reportadas en las rizosferas de plantas de maíz cuando suelos con y sin historial de uso del herbicida fueron sometidos a aplicaciones sucesivas de GP. Este efecto se relacionó con un aumento en la biomasa de raíces muertas en el suelo (Schlatter *et al.*, 2017). En el suelo P0 de nuestro estudio, podría ocurrir una situación similar debido a la presencia de un mayor contenido vegetal en el suelo producto de la alta densidad de plantas por área existente originalmente, al tratarse de un suelo no productivo cubierto de pasturas. Sin embargo, se deberán realizar otros experimentos para determinarlo.

En este trabajo se encontró que la adición de GP perturbó la interdependencia bacteriana, reduciendo el número sus interacciones. La disrupción parcial de la red de asociaciones bacterianas fue particularmente llamativa en el suelo P0. Notablemente, las asociaciones bacterianas en suelos con varios años de exposición a GP ya eran bajas, y por lo tanto fueron menos afectados por una nueva aplicación del herbicida. Las interacciones de las comunidades microbianas a través de relaciones competitivas y cooperativas contribuyen con el mantenimiento de la función del ecosistema (Hibbing *et al.*, 2010). En este sentido, las implicaciones funcionales de las perturbaciones observadas en las interacciones microbianas causadas por aplicaciones a corto y largo plazo del GP son nuevos interrogantes que surgen de este estudio y aún quedan por dilucidar. Así mismo, si las concentraciones residuales de AMPA mantenidas en el tiempo podrían disturbar también las interdependencias bacterianas, similar a lo observado en los suelos A5 y A10 de este estudio.

Se ha reportado que el GP induce un estado de latencia en algunas bacterias debido a condiciones sub-óptimas provocado por la presencia del herbicida, mientras otros taxones bacterianos de la rizosfera se estimulan (Newman et al, 2016b). Los autores de dicho estudio plantearon la hipótesis de que estas diferencias pueden ser reflejo de una selección de microorganismos tolerantes al GP y la eliminación gradual de taxones sensibles al herbicida.

Alternativamente, algunos autores plantean que la disminución relativa de la riqueza de especies puede tener un efecto menor en el suelo por el enorme número de especies presentes y la redundancia funcional existente en este ecosistema (Jacobsen y Hjelmsø, 2014; Setälä *et al.*, 2005; Wertz *et al.*, 2006). Otros plantean que diferentes especies de bacterias y hongos que metabolizan el GP pueden actuar como “*buffer*” del sistema, protegiendo a especies susceptibles (Dicck y Quinn, 1995; Kepler *et al.*, 2018).

En nuestro estudio no encontramos evidencias de la presencia de especies más tolerantes al GP en suelos con historiales de 5 y más de 10 años de uso del GP, que pudiera detectarse a

nivel de cambios en las abundancias, diversidad y riqueza de los diferentes taxones ante el uso del producto; y que esto tuviera un impacto significativo en la degradación del herbicida en el campo respecto al suelo sin historial.

No obstante, como las múltiples funciones de la mayoría de los microorganismos del suelo aún son poco conocidas, la pérdida de especies o genotipos no es una condición deseable para la función integral del suelo. Es decir, la redundancia funcional con respecto a un proceso en particular no excluye necesariamente otras contribuciones específicas de especies únicas a otros procesos, como del mismo modo, las especies pueden realizar diferentes funciones bajo condiciones diferentes (Setälä *et al.*, 2005).

Capítulo 4. Detección de genes funcionales relacionados con la degradación del glifosato en suelos pampeanos.

4.1 Introducción

4.1.1 Uso de los genes funcionales como marcadores del proceso de degradación

El estudio de la expresión de genes en ambientes complejos como el suelo, presenta variadas limitaciones del orden tecnológico, ambiental y analítico. Las limitaciones tecnológicas radican en que la mayoría de los microorganismos nativos no han podido ser cultivados y la información de sus genomas completos no está disponible; en este sentido se dificulta el diseño de cebadores para capturar poblaciones microbianas, producto además de sus variaciones espaciales y geográficas. Además, la diversidad de un mismo gen inter y entre especies y la eficiencia en la extracción del ARNm de muestras ambientales, se encuentran entre las dificultades más importantes. Entre las condiciones ambientales que influyen en que un gen se exprese o no y la medida en que lo hace, se incluyen la disponibilidad de nutrientes, la humedad, la temperatura, el pH, etc. Por último, la principal limitante analítica consiste en poder hacer correlaciones entre la expresión de los genes y las actividades biológicas y bioquímicas medidas (Saleh-Lakha *et al.*, 2005).

El análisis molecular de la expresión y abundancia de genes de interés es un método prometedor para comprender las funciones de los microorganismos en el ambiente. Sin embargo, existe un vacío de información sobre el tema. Entre los métodos que se han utilizado en las investigaciones de este tipo están la PCR cuantitativa en tiempo real y la PCR competitiva con transcripción inversa. De esta manera se ha monitoreado la expresión de genes relacionados con el ciclo del nitrógeno, la resistencia a antibióticos, la respuesta a estrés y la bioremediación. Algunos de estos estudios han hecho foco en las poblaciones edáficas, en general (Baelum *et al.*, 2008; Henderson *et al.*, 2010), mientras otros inoculan las cepas microbianas de interés en el suelo y evalúan sus funciones en el medio (Devers *et al.*, 2004; Shannon *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008). Los principales retos en esta área consisten

en aumentar la captura de los genes más representativos de las comunidades relacionadas con la actividad en estudio y explorar su comportamiento en ambientes cambiantes, como por ejemplo: prácticas agrícolas, salinidad, contaminación, rizosfera vs suelo desnudo, entre otros (Saleh-Lakha *et al.*, 2011).

4.1.2 Enzimas y genes involucrados en las rutas catabólicas del glifosato

Aunque un gran número de microorganismos han sido aislados y caracterizados por su capacidad para degradar el GP, aun se ha explorado muy poco sobre los genes funcionales y las enzimas involucradas en dicho proceso. En los casos en los que se encuentra información, ésta se refiere a cepas individuales, para las que, en algunas ocasiones, sus respuestas *in vitro* e *in situ* difieren en cuanto a la eficiencia del proceso (Hove-Jensen *et al.*, 2014; Sviridov *et al.*, 2014; Zhan *et al.*, 2018). La información disponible hasta este momento sobre la identificación de genes funcionales a nivel de ecosistema, consta del estudio de un ambiente acuático contaminado con GP, a través de técnicas independientes del cultivo (Huntscha *et al.*, 2018). La caracterización de las comunidades microbianas relacionadas con la degradación del GP en diferentes suelos, midiendo la expresión o la abundancia de genes funcionales específicos, no ha sido abordada hasta el momento.

Respecto a las dos vías metabólicas de degradación del GP y las enzimas involucradas, en la vía de la sarcosina, los microorganismos utilizan el herbicida como fuente de fósforo. Para ello ocurre el clivaje del puente carbono-fósforo (C-P) de la molécula mediante la acción de una enzima C-P liasa. Como resultado, se producen N-metilglicina, también conocida como sarcosina, y una molécula conteniendo fósforo. Posteriormente, el radical metilo de la N-metilglicina puede ser transferido a los derivados del ácido tetrahidrofólico para su posterior metabolismo a través de las vías metabólicas del carbono, con la formación simultánea de glicina (Hassan Abdallah *et al.*, 2005). También puede ocurrir que, en presencia de dioxígeno, N-metilglicina sea convertida en peróxido de hidrógeno, formaldehído y glicina (Meskys *et*

al., 2001) (Figura 9).

En la segunda ruta metabólica, ocurre el clivaje del puente carboximetileno-nitrógeno por la acción de una oxidasa, con la formación del ácido amino metil fosfónico (AMPA) y glioxilato. Posteriormente, el glioxilato es oxidado a dióxido de carbono, a través del ciclo de los ácidos glioxílicos, mientras que el AMPA es catabolizado por acetilación, seguido de la ruptura del puente C-P, por la acción de la C-P liasa (Figura 9).

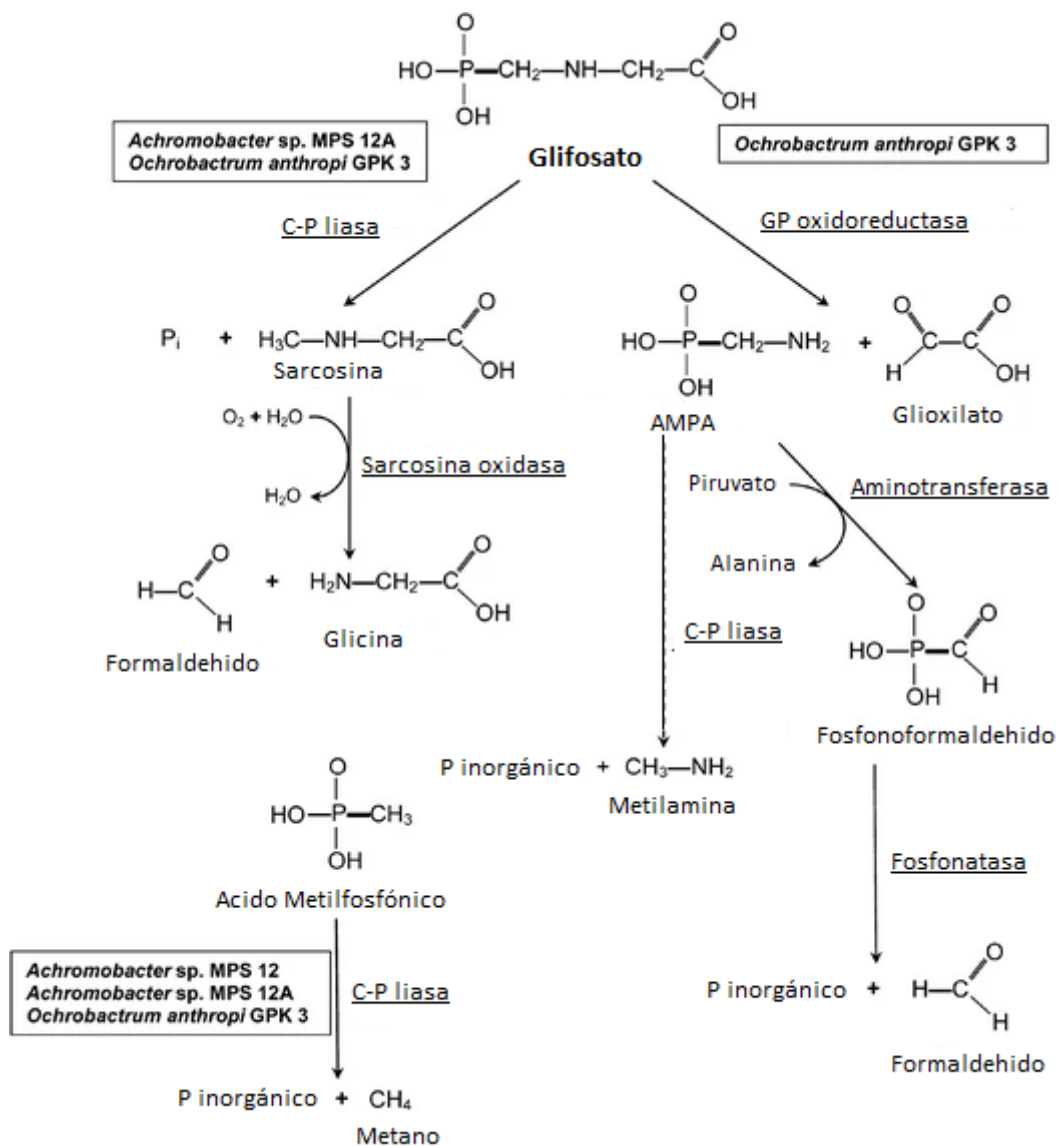


Figura 9. Vías de degradación del glifosato (fosfonatos) y sus metabolitos: sarcosina (N-metilglicina) y AMPA, descritas para *Achromobacter* sp. y *Ochrobacterum anthropi* (Sviridov et al., 2012).

Las C-P liasas están bien representadas entre las bacterias y la mayoría contiene un único operón asociado a la síntesis de 14 polipéptidos: *phn* CDEFGHIJKLMNOP, que codifican para enzimas catabólicas y proteínas que transportan los ácidos fosfónicos al interior de la célula (Chen *et al.*, 1990).

Muchas de las enzimas C-P liasas no son específicas para el GP, ya que pueden romper el puente C-P de un gran rango de alquilfosfatos y aminoalquilfosfatos. Las cepas bacterianas que poseen C-P liasas específicas para GP, exhiben alta eficiencia de degradación en condiciones de laboratorio, pero su actividad disminuye drásticamente en ambientes naturales, probablemente porque el complejo C-P liasa es inducido cuando el P intracelular (Pi) es deficiente, lo cual no es común en suelos agrícolas (Sviridov *et al.*, 2011; Sviridov *et al.*, 2015). Sin embargo, otras C-P liasas han mostrado actividad en ambientes ricos en P, lo que podría indicar que su sensibilidad al P es diferente entre las diversas especies bacterianas, pero esto no ha sido comprobado porque no se han aislado y caracterizado dichas proteínas (Fan *et al.*, 2012).

Por su parte, los microorganismos que degradan el GP por la vía del AMPA lo hacen a través de una oxidasa y en este sentido se han identificado dos enzimas: glifosato oxidasa y glicina oxidasa, codificadas por los genes *gox* y *thiO*, respectivamente. Ambas proteínas han mostrado una baja afinidad por el GP *in vitro*. En los últimos años se han realizado manipulaciones genéticas para mejorar sus parámetros cinéticos de utilización del GP como sustrato (Han *et al.*, 2015; Pedotti *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2016).

Las enzimas glicina oxidasas (GOs) están ampliamente presentes en especies de los géneros *Ochrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Bacillus* (Iyer *et al.*, 2018). Estas proteínas comparten el mismo dominio catalítico, pero su secuencia proteica es altamente variable. Por ejemplo, las GOs de *B. subtilis* y *B. cereus* solo comparten el 33 % de similitud. Este grado de variación en las GOs, aún dentro de la misma especie, es similar a la detectada

anteriormente para las organofósforo hidrolasas (OPHC2) de bacterias rizosféricas y probablemente esté relacionado con su baja actividad catalítica (Iyer *et al.* 2018). Un aumento en la afinidad de las GOs por el GP está relacionado con mutaciones en las posiciones 51 y 54 del sitio catalítico (Zhan *et al.*, 2013).

A diferencia de las C-P liasas, la regulación de la actividad de las enzimas oxidantes del GP es independiente de la fuente de P externo (Jacob *et al.*, 1988).

Por último, se han descrito otros genes relacionados con la degradación de GP en cepas específicas: los genes *glpA* y *glpB* de *Pseudomonas pseudomallei*, que confieren tolerancia al herbicida (Penaloza- Vazquez *et al.*, 1994) y el gen LBAA *gox* de *Ochrobactrum anthropi* expresado en células vegetales (Gard *et al.*, 1997).

4.1.3 *Bradyrhizobium* sp. como grupo de estudio

Bradyrhizobium es uno de los géneros que agrupan bacterias simbioses, fijadoras del nitrógeno, capaces de formar nódulos en leguminosas. El número de especies conocidas de *Bradyrhizobium* se ha incrementado en los últimos años y recientemente se ha reportado que aunque algunas especies han perdido los grupos de genes *nod/nol* y *nif/fix*, relacionados con la nodulación y la fijación del N atmosférico, esto no las limita para establecer asociaciones estrechas con las plantas. Además, estas poblaciones tienen un potencial mayor que aquellas simbioses para metabolizar otras fuentes de carbono, incluyendo las aromáticas (VanInsberghe *et al.*, 2015).

El hecho que *Bradyrhizobium* sp. es muy abundante en el suelo, aun en ausencia de plantas leguminosas (Schneijderberg *et al.*, 2018) y que la disponibilidad de genomas secuenciados de diferentes especies del género es cada vez más alta, lo convierten en un modelo interesante para estudiar su adaptación a la vida libre en suelos agrícolas bajo modelos contrastantes, revelando el potencial de este importante género a nivel global (Jones *et al.*, 2016), no solo como promotor del crecimiento vegetal sino también en la remediación de los suelos

contaminados.

Una amplia diversidad metabólica fue observada en cepas edáficas de rizobios en respuesta al GP, incluyendo cepas de *Bradyrhizobium* capaces de crecer en presencia del herbicida como única fuente de C y energía (Zabaloy *et al.*, 2005). Esta evidencia y las anteriores indicarían que es probable la existencia de especies o genotipos de *Bradyrhizobium*, que podrían degradar eficientemente el GP en ambientes naturales.

Bradyrhizobium puede establecer simbiosis con muchas leguminosas, siendo una de las razones por la que es utilizada en formulaciones comerciales de inoculantes para la producción de soja y otros cultivos. En Argentina, *Bradyrhizobium japonicum* E109 es inoculada en el 85 % de la superficie sembrada con soja por su eficiente colonización de raíces y fijación de nitrógeno y su incremento en la productividad (Peticari *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha reportado que *B. japonicum* es sensible al GP, limitando su simbiosis (Zablotowicz y Reddy, 2004).

Dada la importancia agronómica de *Bradyrhizobium*, su abundancia y gran diversidad en los suelos, su versatilidad metabólica y la disponibilidad creciente de sus genomas secuenciados, este capítulo tuvo como objetivos diseñar cebadores específicos para cuantificar la abundancia de genes de este género relacionados con la degradación del GP y caracterizar su presencia en diferentes suelos ante la aplicación del herbicida.

Se pusieron a prueba las siguientes hipótesis:

- Los suelos contienen especies del género *Bradyrhizobium* con genes involucrados en una de las vías funcionales de degradación del glifosato.
- La abundancia de genes funcionales de *Bradyrhizobium*, relacionados con la degradación del glifosato, aumenta con la aplicación del herbicida y se relaciona con su degradación en el suelo.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Diseño de cebadores para la amplificación del gen *thiO*

Las secuencias nucleotídicas del gen de la glicina oxidasa (*thiO*), reportadas para diferentes especies de *Bradyrhizobium*, se extrajeron de la base de datos de NCBI. Se alinearon entre sí y se buscaron dominios conservados mediante el programa MEME Suite 5.0.5 (Bailey *et al.*, 2009). Basados en la localización de estos motivos, se realizó el diseño de cebadores específicos usando el programa Prime3Plus (Untergasser *et al.*, 2012). La mejor combinación de cebadores se seleccionó en base a su especificidad, evaluada mediante el uso de Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012). Además se analizaron las temperaturas de fusión (T_m) y la probabilidad de formación de estructuras secundarias, homodímeros y heterodímeros mediante la herramienta OligoAnalyzer disponible en el portal de IDT (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>).

4.2.2 Validación de la especificidad de los cebadores diseñados

Se realizaron reacciones de PCR usando como templado el ADN de la cepa de referencia *Bradyrhizobium japonicum* E109 (donada por el Dr. Guillermo Maroniche) y el ADN del suelo A10. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Techne®3Prime (UK), en un volumen final de 25 μ l conteniendo 1U de la enzima OneTaq® DNA polimerasa (BioLabs, New England), 1X One Taq Standard Buffer, 200 μ M de dNTPs, 200 nM de cada cebador *thiO* diseñado (Tabla 1). El programa consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 seg., un paso de hibridación por 30 seg. y la extensión a 72 °C por 30 seg. Para la hibridación se probó en un rango de temperatura de 58 °C a 62 °C. El paso final consistió en la extensión a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa 1,5 % (TBE 1X) teñido con Gelred® bajo luz UV, para chequear el tamaño esperado del amplicón.

Para chequear la especificidad de los cebadores, los amplicones obtenidos fueron clonados y secuenciados y las secuencias obtenidas fueron alineadas con aquellas homólogas de glicinas oxidasas de *Bradyrhizobium*.

La ligación fue realizada usando el vector pGEM®-T (Promega, EUA). La reacción se incubó toda la noche a 16°C y estuvo compuesta por el inserto (producto de PCR) y el vector en relación 3:1, la enzima T4 DNA ligasa y el buffer de ligazón (Promega, EUA), según las concentraciones recomendadas por el fabricante. Posteriormente, se añadieron 2 µl de la reacción de ligazón a 50µl de células competentes químicas Top10. Se mezcló suavemente y se dejó en hielo durante 20 min. Seguidamente se sometieron a un shock térmico durante 50 seg a 42°C y posteriormente se llevaron al hielo nuevamente durante 2 min. Se le agregaron 200 µl de medio SOC (2% p/v triptona, 0.5% p/v extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa) y se incubó a 37°C durante 1h en agitación. Transcurrido ese tiempo se inocularon, por duplicado, 100 µl de este pre-cultivo en placas de Petri conteniendo medio Luria-Bertani (LB) con antibiótico ampicilina (100 µg ml⁻¹), X-Gal (80µg ml⁻¹) y 0.5 mM de Isopropil β-d-1-tiogalactopiranosido (IPTG) para la selección de transformantes. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 h y se procedió a la selección de las colonias blancas, indicativas de que poseían el inserto. Estas colonias se picaron individualmente y diluyeron en 10 µl de H₂O destilada estéril, de los cuales 2µl fueron sembrados nuevamente en placas de LB+ampicilina para su conservación y el resto se destinó a comprobar la presencia del inserto mediante una reacción de PCR “colony PCR” usando los cebadores diseñados.

Para la extracción del ADN plasmídico, los transformantes que contenía el inserto, chequeado por PCR, se sembraron en 3 ml de medio LB a 37°C durante 18 h en agitación. Posteriormente las células se precipitaron por centrifugación a temperatura ambiente 3000 g durante 10 min. Seguidamente se resuspendieron en 300µl de solución P1 fría (50 mM Tris-

HCl pH8, 10 mM EDTA) con vortex. Se le agregaron 300 µl de solución P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) y se dejó aclarar por 5 min. A continuación, se adicionaron 300µl de solución P3 fría (3M KAc pH 5,5) y se incubó 15 min en hielo. Posteriormente se centrifugó a 15 000 g por 10 min y se tomó el sobrenadante, al que se le agregaron 0.6 vol. de isopropanol. Se centrifugó nuevamente a 15 000 g por 10 min y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó con etanol 70%, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl de H₂O miliQ estéril. Antes de su almacenamiento a -20°C, se trató con RNAsa A (100µg/ml). Previo a la secuenciación, el ADN plasmídico fue purificado usando el protocolo propuesto por Sambrook y Russell (2001) y cuantificado en un espectrofotómetro Epoch (BioTek, EUA) según la absorbancia a 260 nm y la relación A₂₆₀/280.

La secuenciación se llevó a cabo en MacroGen Inc. (Corea), en un secuenciador Applied Biosystems 3730XL, usando los cebadores: promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG - 3') y SP6 (5'- ATTTAGGTGACACTATAG - 3').

Las secuencias generadas y las homólogas, determinadas mediante BLASTn (NCBI), fueron sometidas a un alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas (Multiple sequence alignment: MSA) usando el programa T-Coffee. Su similitud fue visualizada mediante un árbol de máxima verosimilitud (modelo de substitución HKY85, algoritmo SPR, bootstrap=100) usando la plataforma PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010).

4.2.3 Cuantificación del gen *thiO* a partir de suelos aplicados con GP en condiciones de campo y de microcosmos.

Este ensayo se realizó en dos partes: (A) la primera incluyó las muestras de los suelos con y sin historial de uso del GP analizados en los capítulos anteriores: A10 y P0, con sus tratamientos control y tratado con GP en condiciones de campo, los días 0, 1, 8 y 16 posteriores a la aplicación, y (B) la segunda parte analizó diferentes suelos de la región

pampeana sometidos a una aplicación de GP en condiciones de microcosmos.

Para el ensayo en microcosmos, se colectaron muestras compuestas en cada uno de los suelos agrícolas provenientes de las localidades de Barrow, Marcos Juárez y Pergamino, con historiales de al menos 5 años de uso del herbicida. El suelo A10 de Balcarce fue incluido en este ensayo como referencia. Las muestras de suelo, tomadas a una profundidad de 0-5 cm, fueron homogenizadas, tamizadas y secadas al aire. Todos los suelos fueron sometidos a dos tratamientos que consistieron en 5 gramos de suelo aplicados con una solución de GP comercial (DuPont® Premium HL 48% w/v) a razón de 6 mg de i.a. kg⁻¹ de suelo y otro control sin aplicación, por triplicado. Los suelos se incubaron en la oscuridad a 24 °C durante 16 días y la capacidad de campo se mantuvo en 60%. Transcurrido este período, se extrajo el ADN del suelo, según la metodología descrita con anterioridad.

La cuantificación del gen *thiO* se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), en termociclador ABI7500 (Applied Biosystem, EUA). Como referencia, fue amplificada la secuencia del gen *rpoB* descrito para *Bradyrhizobium* (Tabla 8). Para este amplicón se generaron curvas estándares a partir de diluciones seriadas en base 10 del producto de PCR purificado. La eficiencia de las qPCRs para cada gen blanco se calculó según la fórmula: $E = (10^{-1/\text{pendiente}}) - 1$, también se determinó la pendiente de las curvas estándares, los coeficientes de regresión lineal (R^2) y la intercepción con el eje y.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µL, conteniendo 10 ng del templado de ADN, 1X Faststart SYBRgreen (Roche Diagnostics Ltd, UK) y 0.3 µM de cada cebador para el gen *thiO*, 0,2 µM de directo/0,1 µM de reverso para *rpoB* *Bradyrhizobium*. El ciclo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 min seguidos de 40 ciclos de 94°C, 15 seg y un paso final de extensión durante 1 min. Los cebadores específicos y las temperaturas de *annealing* aparecen en la Tabla 8. En cada corrida se incluyeron reacciones control (NTC: “No Template Control”), sin presencia de templado.

Tabla 8. Cebadores usados en las reacciones de qPCR.

| Gen blanco | Cebadores | Secuencia 5' → 3' | Tm (°C) | Referencia |
|-----------------------|--------------|-------------------------|---------|----------------------|
| <i>thiO</i> | thiO_directo | GCGAGGACAATCTGTTCATGC | 60 | Este estudio |
| <i>Bradyrhizobium</i> | thiO_reverso | CGGGTGCACGGTATAGGC | | |
| <i>rpoB</i> | rpoB_Fw1 | CGCTGAAGAACCTCGACGAAGCC | 62 | Schneijderberg |
| <i>Bradyrhizobium</i> | rpoB_Rv1 | CGGCGTGATCTTGCCGACCAG | | <i>et al.</i> , 2018 |

La amplificación específica de los fragmentos de los genes se comprobó mediante curvas de disociación teniendo como resultado la presencia de un único pico a la temperatura de fusión (Tm) esperada para cada amplicón. Cada muestra se analizó por duplicado y en reacciones diferentes. Los resultados fueron expresados como el logaritmo del número de copias de ADN por μg de ADN y fueron analizados estadísticamente mediante modelos mixtos lineales usando el procedimiento PROC MIXED (SAS Institute version 9.0, 2002). El tratamiento fue considerado como efecto fijo, el sitio como efecto aleatorio y la medida repetida fue el tiempo, entendido como los diferentes momentos de muestreo. Los valores de Ct (del inglés “*cycle threshold*”, traducido como ciclo umbral) se relacionaron con el logaritmo del número de copias del gen de estudio a través de la fórmula: $\log T_0 = -\log E \times Ct + \log K$, donde T_0 es la cantidad inicial de ADN, E es la eficiencia de la PCR y K es el valor de Ct calculado para una cantidad inicial de ADN igual a 0. Posterior a la realización de la qPCR, cada producto fue sembrado en un gel de agarosa 1,2 % para hacer una comprobación visual del tamaño esperado para el fragmento amplificado.

4.2.4 Identificación de los genotipos de *Bradyrhizobium* presentes en los suelos A10 y P0

A manera de complementar los análisis anteriores, mediante la inferencia de los posibles genotipos de *Bradyrhizobium* involucrados en la degradación del GP en los suelos A10 y P0, se utilizaron los datos genómicos generados para el estudio de las comunidades bacterianas correspondientes a los amplicones del gen ARNr 16S, descritos anteriormente. Para ello se filtraron las tablas de OTUs elaboradas para cada suelo, obteniéndose las secuencias representativas pertenecientes a este género bacteriano previamente identificadas taxonómicamente con un porcentaje de similitud superior al 97%. Se realizó un MSA de todas las secuencias extraídas y sus secuencias homólogas, obtenidas mediante BLASTn en la base de datos de genomas microbianos del NCBI y en RDP (Ribosomal Database Project: <https://rdp.cme.msu.edu>). El grado de similitud fue visualizado mediante un árbol de máxima verosimilitud, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

4.3 Resultados

4.3.1 Validación de los cebadores *thiO*

Los motivos nucleotídicos conservados en el gen *thiO* dentro de *Bradyrhizobium* fueron obtenidos a partir del MSA de las glicinas oxidasas reportadas en NCBI para *B. japonicum* E109 [CP01031]; *B. japonicum* USDA6 [AP012206]; *B. diazoefficiens* USDA110 [CP011360]; *B. diazoefficiens* XF7 [CP029603]; *B. diazoefficiens* NK6 [AP014685]; *B. ottawaense* [CP029425]; *B. lablabi* [LT670845]; *B. erythrophlei* [LT670817]; *B. sp* G22 [LN907826]; *B. sp* SK7 [CP025113] y *B. sp* CCBAU 51778 [CP022221]. Estos motivos son graficados en la Figura 10, donde se señalaron los cebadores seleccionados para la amplificación de un fragmento de dicho gen mediante ensayos de PCR y qPCR.

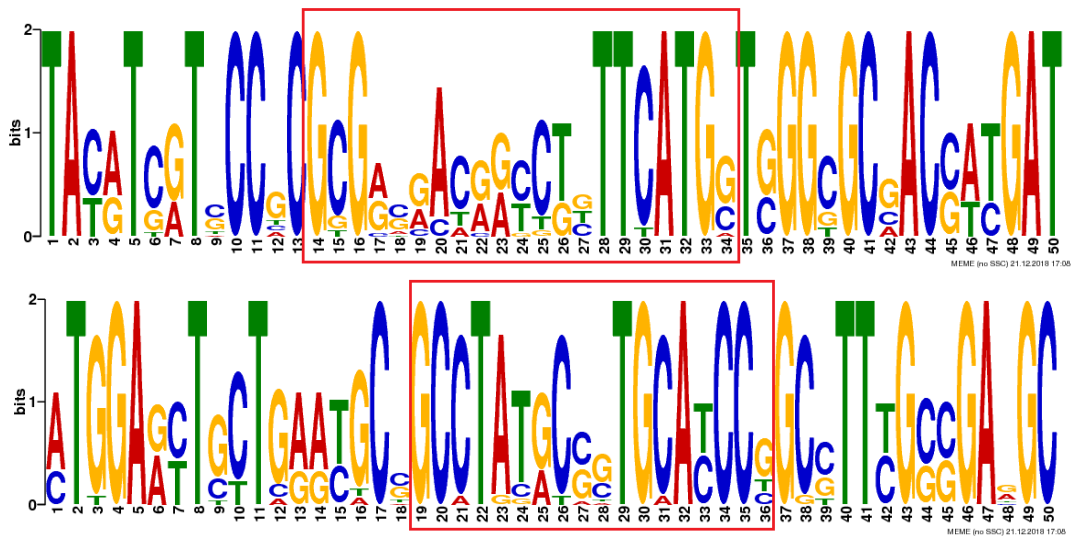


Figura 10. Motivos nucleotídicos conservados entre las secuencias del gen glicina oxidasa (*thiO*) reportadas para especies de *Bradyrhizobium* disponibles en NCBI. En los recuadros rojos aparecen las localizaciones, en la cadena +, de los cebadores “forward” (arriba) y “reverse” (abajo) diseñados en este estudio.

Para la amplificación del fragmento del gen *thiO* mediante PCR, a la temperatura de alineamiento 60 °C de los cebadores se obtuvo una cantidad de producto significativamente mayor a la obtenida en reacciones ensayadas a otras temperaturas. Esta diferencia fue más notoria para la muestra de suelo A10, partiendo del hecho que la intensidad de su banda, visualizada en el gel de agarosa, fue siempre menor en comparación con la de la cepa de referencia (Figura 11A).

Las amplificaciones a partir de la cepa *B. japonicum* y a partir de la muestra de suelo A10 produjeron fragmentos del tamaño esperado: 110 pb (Figura 11A), los que fueron clonados y secuenciados. De las 9 colonias transformantes analizadas para la muestra de suelo A10, 8 tenían el inserto del fragmento del gen *thiO* (ThiO-2 a ThiO-9), corroborado mediante el alineamiento de secuencias por BLASTn. La secuencia que difirió (ThiO-1), correspondió a una proteína del tipo transportadora ABC, que une ATP, de *Intraesporangio calvum* (Actinobacteria). Este resultado era esperado porque el producto observado a partir de la “colony-PCR” era ligeramente mayor (Figura 11B). No obstante, se incluyó en el análisis

para comprobar la especificidad del par de cebadores seleccionado. La secuencia ThiO-10 correspondió al gen de la glicina oxidasa de *B. japonicum* E109, utilizado como cepa de referencia en este estudio.

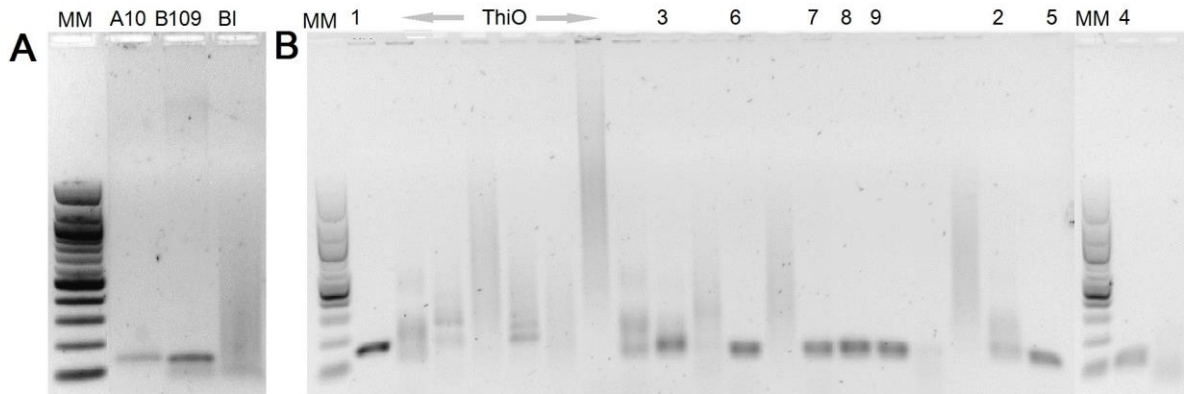


Figura 11. Productos de la amplificación del gen *thiO* con los cebadores diseñados. A) A partir de la muestra de ADN del suelo con más de 10 años de historial de uso del glifosato (A10) y de la cepa *B. japonicum* E109 (B109). B) A partir de una “colony-PCR” partiendo de colonias transformadas con amplicones provenientes del suelo A10. MM= Marcador de peso molecular 100 pb (Biolabs, USA); BI= reacción blanco de la PCR.

El grado de similitud entre las secuencias obtenidas y las secuencias de las glicinas oxidasas reportadas es mostrado en la Figura 12. Todos los amplicones alinearon con secuencias de *Bradyrhizobium* sp y se distinguieron al menos dos variantes genotípicas diferentes. Estas secuencias se encuentran anotadas en NCBI bajo el número de acceso: BankIt 2280869 (MN684356-MN684364).

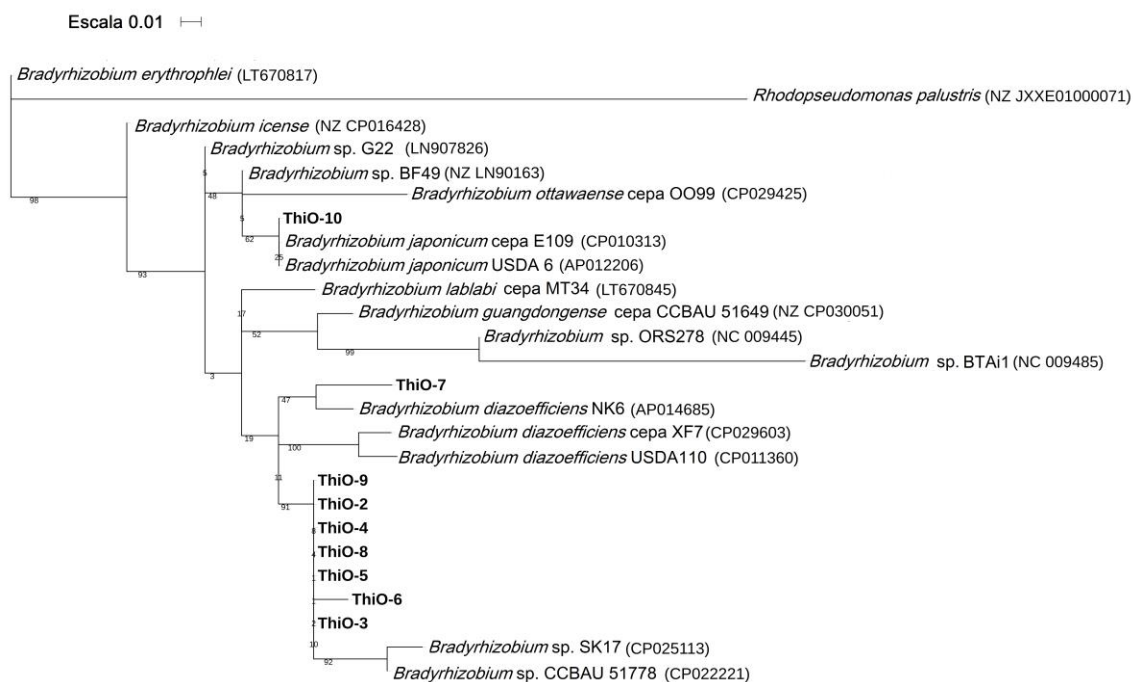


Figura 12. Similitud entre los amplicones de *thiO* secuenciados y las secuencias homólogas de las glicinas oxidasas para *Bradyrhizobium* reportadas en NCBI. Los números en los nodos indican el porcentaje de réplicas en las cuales las secuencias se asociaron de la misma manera en el árbol mediante análisis de máxima verosimilitud (Prueba “Bootstrap”, 100 réplicas).

4.3.2 Desarrollo del ensayo de q-PCR

Después de evaluar la especificidad de los cebadores, se realizaron las reacciones de qPCR a temperatura de *annealing* 60°C. Las curvas de calibración, utilizando los productos de PCR de los genes *rpoB* y *thiO* a partir de *B. japonicum* E109, fueron lineales en el rango de 10^1 a 10^6 copias en función de los valores de Ct y mostraron factores de correlación adecuados. Para *thiO* los valores de R^2 variaron entre 0.9949 y 0.9982 y para *rpoB* fueron de 0.9935 a 0.9980 (Anexo 1). Las eficiencias de amplificación estuvieron entre el 105 y el 111.65 % para *thiO* y de entre 106.75 y 114.45 % para *rpoB*.

Las curvas de disociación para *rpoB* mostraron un único pico con una T_m entre 81.1 y 81.5°C, mientras que para *thiO* variaron entre el producto obtenido a partir de *B. japonicum* E109 (entre 85.2 y 85.6°C) y el obtenido de las muestras de suelo (entre 81.7 y 82.4) (Anexo 2). Un análisis *in silico*, mediante el alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes

al fragmento del gen *thiO* amplificado por los cebadores diseñados, evidenció diferencias por la presencia de “*mismatches*” entre la secuencia de la cepa de referencia *B. japonicum* E109 y la de diferentes especies de *Bradyrhizobium* relacionadas por similitud con los genotipos mayoritariamente presentes en las muestras de P0 y A10; explicándose de esta manera las variaciones encontradas en las Tm (Anexo 3). Las reacciones control (NTC) no amplificaron, ni mostraron la formación de productos inespecíficos.

4.3.3 Cuantificación del gen *thiO* a partir de suelos aplicados con GP en condiciones de campo y de microcosmos.

A. Cuantificación del gen *thiO*_*Bradyrhizobium* en los suelos estudiados en condiciones de campo: A10 y P0.

De manera general se observó que el gen *thiO* de *Bradyrhizobium* se detectó en momentos diferentes en cada suelo después de la aplicación del GP; siendo más temprana y abundante en P0 y más tardía en A10.

Para el suelo P0, en el tratamiento control, el gen *thiO* se detectó solo los días 0 y 1 con una disminución en su número de copias ($p=0.0081$) en el tiempo. En el suelo aplicado, la abundancia de *thiO* aumentó 1 día después de aplicación ($p=0.0154$) y se mantuvo en el día 8; mientras que en el día 16 no se detectó este gen (Figura 13). Por su parte, la abundancia de *Bradyrhizobium*, medida a través del gen *rpoB*, no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, y tanto en el control como en el suelo tratado se observó un aumento de la abundancia en el tiempo, teniendo en cuenta los valores iniciales detectados en el $t=0$ ($p=0.001$).

En el suelo A10 la abundancia del gen *thiO* mostró diferencias entre tratamientos ($p=0.007$) y en el tiempo ($p=0.0154$). En el suelo control se cuantificó su presencia todos los días analizados con un aumento significativo en el día 8 ($p<0.0041$). Sin embargo, en el suelo aplicado, se detectó un bajo número de copias el día anterior a la aplicación y no se detectó

más hasta para el día 16. Por su parte, la abundancia *Bradyrhizobium* también varió de manera significativa con el tratamiento y el tiempo ($p=0.0144$ y $p=0.0014$, respectivamente). En el suelo aplicado ocurrió una disminución de la abundancia de *Bradyrhizobium* un día después de la aplicación. Aunque no fue significativa respecto a los valores iniciales ($t=0$), se diferenció de los valores del número de copias a los 8 y 16 días en el tratamiento con GP ($p<0.0333$) y de los días 1, 8 y 16 del suelo control ($p<0.003$) (Figura 13).

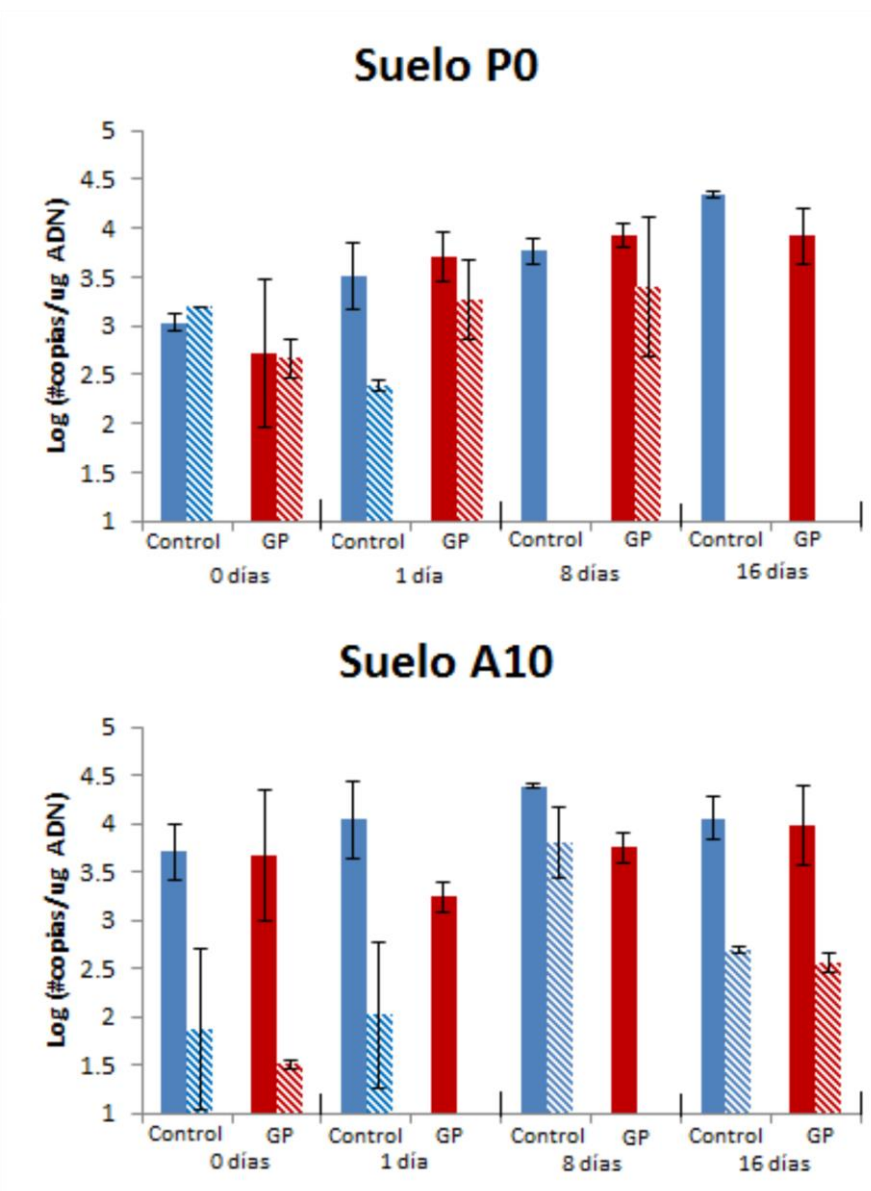


Figura 13. Cuantificación del número de copias del gen *thiO* (barras rayadas) y del gen *rpoB* (barras enteras) para *Bradyrhizobium sp.* en los suelos P0 y A10, los días 0, 1, 8 y 16 después de la aplicación de glifosato. Las barras representan el número de copias de cada gen promedio por tratamiento: azules = Control y rojas = tratadas con glifosato (GP). Líneas verticales representan el desvío estándar ($n=3$).

Para analizar la composición de especies pertenecientes a *Bradyrhizobium* en P0 y A10, se tomaron las secuencia del gen ARNr 16S específicas del género, filtradas a partir de la información de las comunidades bacterianas obtenidas previamente, y fueron alineadas con las secuencias homólogas de las bases de datos NCBI y RDP. Los resultados son mostrados en la Figura 14, donde se aprecia que los genotipos más representativos de cada suelo son taxonómicamente diferentes.

Los genotipos de *Bradyrhizobium* presentes en P0 se relacionan con especies de los supergrupos *B. jicamae* y *B. elkanii*, mientras los del suelo A10 se relacionan con especies del supergrupo *B. japonicum*, según una filogenia de este género publicada recientemente (Avontuur *et al.*, 2019).

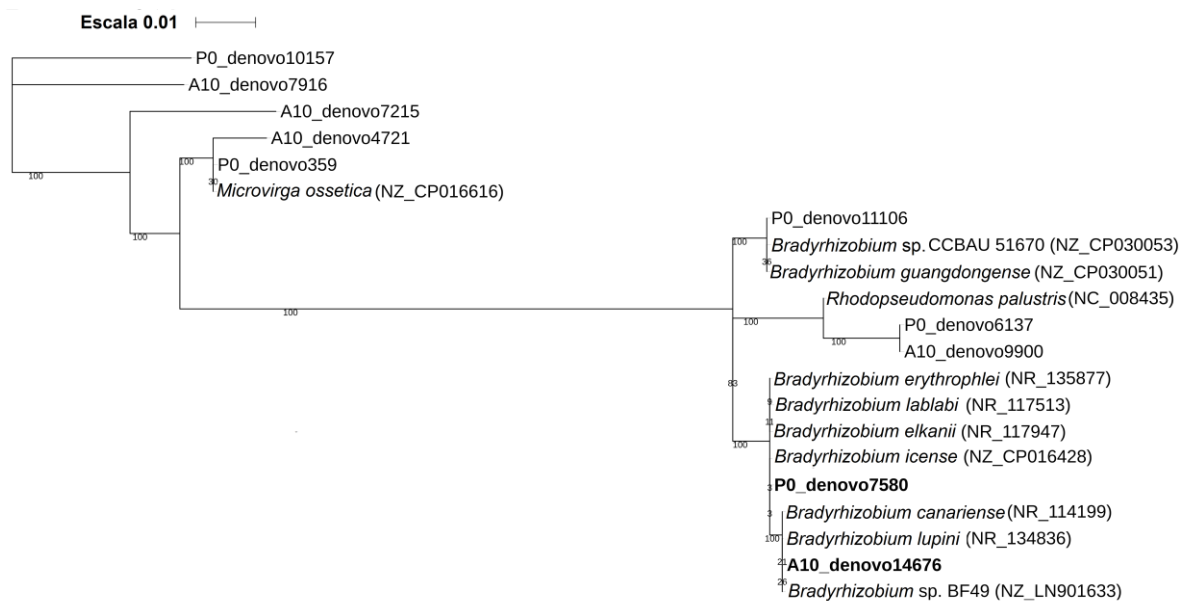


Figura 14. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en las secuencias del gen del ARNr 16S representativas de la familia *Bradyrhizobiaceae* (97%) de los suelos P0 y A10 y secuencias homólogas (base de datos NCBI con números de acceso entre paréntesis). En negrita aparecen resaltadas las secuencias más abundantes en cada uno de los suelos. Los valores estadísticos (bootstraps) fueron inferidos de 100 réplicas y son mostrados en los nodos.

B. Cuantificación del gen *thiO*_Bradyrhizobium en suelos pampeanos estudiados en condiciones de microcosmos.

Se cuantificó el gen *thiO* para *Bradyrhizobium* en los suelos pampeanos ante la aplicación de GP en condiciones de microcosmos, a los 16 días posteriores a la aplicación, para garantizar que el proceso de degradación estuviera en curso, basados en la cinética mostrada en el Capítulo 2. Estos suelos agrícolas tienen historial de uso del GP y sus características físico-químicas son mostradas en la Tabla 9. El suelo de Balcarce A10 fue incluido como referencia (Bl) y sus características edáficas fueron mencionadas anteriormente en el Capítulo 2 de esta tesis.

Tabla 9. Propiedades físico-químicas de los suelos analizados en el ensayo microcosmos para detección del gen *thiO* de degradación.

| Localidad | C.I.C. (cmol kg^{-1}) | Arena (%) | Limo (%) | Arcilla (%) | MO (%) | pH |
|---------------|-------------------------------------|--------------|-------------|----------------|-----------|-----|
| Barrow | 33.5 | 24.9 | 40.2 | 34.9 | 5.0 | 6.5 |
| Pergamino | 16.3 | 18.4 | 54.7 | 26.9 | 3.3 | 6.1 |
| Marcos Juárez | 22.9 | 19.5 | 52.9 | 27.6 | 4.0 | 6.4 |

El gen *thiO* fue detectado en los tratamientos aplicados con GP de todos los suelos en estudio, mientras que no pudo cuantificarse en los suelos control (Figura 15).

El número de copias de *Bradyrhizobium* fue similar en todos los suelos. Para el suelo de Balcarce A10 (Bl), el número de copias detectado en el ensayo en microcosmos fue un orden de magnitud mayor al detectado para la muestra de campo en el mismo período (16 días).

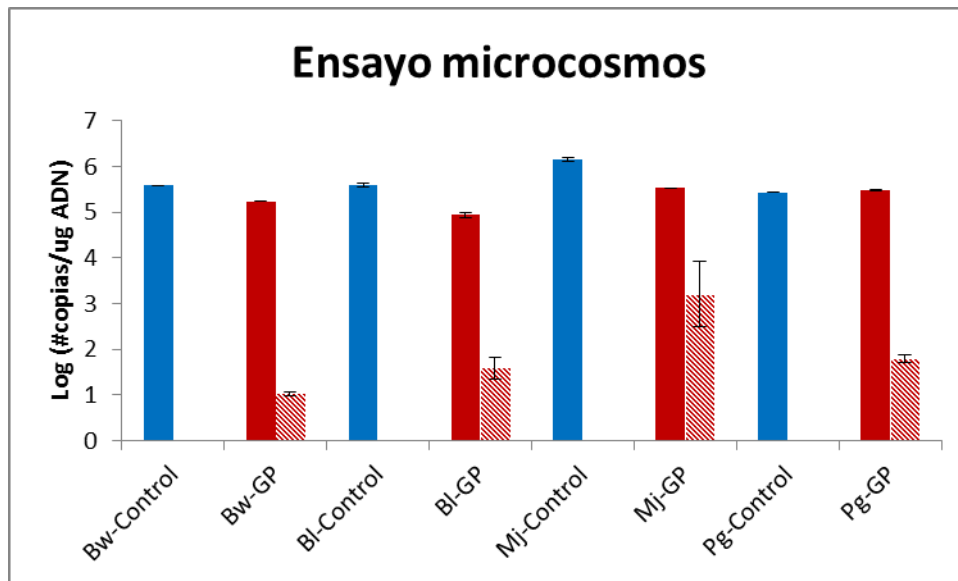


Figura 15. Cuantificación del número de copias del gen *thiO* en relación al gen *rpoB* de *Bradyrhizobium* en suelos agrícolas pampeanos a los 16 días posteriores a la aplicación de GP en ensayo de microcosmos. Barras enteras azules y rojas: cuantificación del gen *rpoB* en los tratamientos control y aplicado (GP), respectivamente. Barras a rayas rojas: cuantificación del gen *thiO* en el tratamiento aplicado (GP). Bw: Barrow; Bl: Balcarce; Mj: Marcos Juárez y Pg: Pergamino. Líneas verticales representan en el desvío estándar (n=3).

4.4 Discusión

En este capítulo se describe un par de cebadores diseñados para cuantificar la abundancia del gen de la glicina oxidasa (*thiO*) de especies de *Bradyrhizobium* presentes en el suelo, mediante un ensayo de q-PCR. *Bradyrhizobium* es un género agronómicamente importante por sus funciones en el ciclo del N y el C en el suelo y su actividad PGPR, por lo que el estudio de su capacidad para degradar GP es una función microbiana de interés para el ambiente.

Los estudios de glicinas oxidasas y detección del gen *thiO*, y su rol en la degradación del GP han sido realizados a partir de cepas bacterianas y a partir de una muestra ambiental de un lago suizo mediante análisis metagenómico (Huntscha *et al.*, 2018; Iyer *et al.*, 2018).

Debido a la baja actividad catalítica de las glicinas oxidasas estudiadas a partir de cepas bacterianas provenientes de suelos con glifosato, Iyer *et al.* (2018) concluyeron en su trabajo que la degradación en suelos agrícolas es facilitada probablemente por la actividad enzimática secundaria promiscua de GOs bacterianas.

Por su parte, Huntscha *et al.* (2018) detectaron el gen *thiO* en muestras provenientes de un lago contaminado estacionalmente con GP y lo relacionaron con bacterias del orden *Burkholderiales* y grupos de cianobacterias. También detectaron los genes *phnCDE*, involucrados en el transporte de fosfonatos, que eran muy abundantes y aparecían asociados a las cianobacterias; y en menor medida los genes *phn KLM*, involucrados en la ruta de la C-P liasa, asignados a *Burkholderiales* y *Enterobacteriales*. Al igual que en el caso anterior, demostraron que microorganismos de múltiples géneros degradaban el GP en el lago y este proceso ocurriría por diferentes vías.

En nuestro estudio, la presencia del gen *thiO* de *Bradyrhizobium* fue detectada en momentos diferentes después de la aplicación del herbicida en suelos con diferente historial de uso del

producto. El análisis de las especies de este género presentes en cada suelo reveló una diferencia que podría relacionarse con este resultado obtenido. Las variantes genotípicas mayoritariamente presente en el suelo P0 (sin historial de aplicación de GP) pertenecen a los supergrupos de *B. jicamae* o *B. elkanni*, mientras que las variantes del suelo A10 (más de 10 años de uso del herbicida) pertenecen al supergrupo de *B. japonicum*. Esta asociación está basada en un estudio filogenético reciente de homología de los genomas completos de diferentes especies del género *Bradyrhizobium* (Avontuur *et al.*, 2019).

Este resultado constituye una aproximación a la identidad taxonómica de las especies de *Bradyrhizobium* nativas de estos suelos, para lo cual hay que señalar dos salvedades. La primera es que la secuencia del gen ARNr 16S carece de poder de resolución para el nivel de género en *Bradyrhizobium*. En segundo lugar, a pesar del gran número de especies descritas y los avances en su compleja clasificación taxonómica, aún no se conocen todas las cepas que pueden estar presentes en la naturaleza (Hungria *et al.*, 2015; Stepkowski *et al.*, 2003).

En el suelo sin historial de uso de GP (P0), la abundancia del gen *thiO* aumentó en los primeros días después de la aplicación, cuando aún las concentraciones edáficas de GP eran altas, teniendo en cuenta la aplicación realizada y detallada en el Capítulo 2 (valores medios: $[GP_{\text{día1}}]=18,3 \text{ mmol kg}^{-1}$, $[GP_{\text{día8}}]=10,8 \text{ mmol kg}^{-1}$), lo que podría relacionarse con la presencia de cepas de *Bradyrhizobium* con potencialidades para degradarlo. En cambio, en el suelo con historial (A10), la abundancia de este gen disminuyó hasta valores no detectados en los días donde las concentraciones de GP en el suelo fueron altas (valores medios: $[GP_{\text{día1}}]=18,7 \text{ mmol kg}^{-1}$, $[GP_{\text{día8}}]=7,1 \text{ mmol kg}^{-1}$) y pudo detectarse nuevamente el gen en los días donde las concentraciones comenzaron a disminuir (medias: $[GP_{\text{día16}}]=5,6 \text{ mmol kg}^{-1}$). En base a estos resultados se pudiera sugerir una susceptibilidad al GP de las especies presentes en el suelo A10. Sin embargo, un dato no menor lo constituyen además las concentraciones residuales de AMPA en A10, producto del uso continuado del GP, que pudieran tener un

efecto inhibitorio sobre estos genotipos, hipótesis que deberá ser probada en futuros estudios. La validación de la prueba diseñada en otros suelos pampeanos demuestra la factibilidad del ensayo para estudiar la presencia del gen de degradación en el género habitando diferentes ambientes. Sin embargo, se necesitan hacer cuantificaciones a tiempos anteriores a los 16 días post-aplicación, para evaluar respuestas tempranas, en ensayos realizados a campo.

Actualmente se debate la selección de marcadores microbianos que sean lo suficientemente sensibles a la exposición a los plaguicidas para monitorear los efectos de estos productos sobre los organismos no blanco del suelo (Thiour-Mauprivez *et al.*, 2019). Las bacterias en la naturaleza pueden degradar plaguicidas de manera amigable con el medio ambiente, con un bajo costo y sin causar una contaminación secundaria. Sin embargo, el entorno natural, complejo y cambiante, puede afectar la viabilidad y la eficiencia de la degradación microbiana por lo que este estudio hace una contribución a la caracterización de la degradación del GP y se aproxima a la identificación de bradirizobios involucrados en la transformación del herbicida en el suelo, como una función adicional a los importantes servicios ecosistémicos que brindan los integrantes de este grupo.

Futuros estudios deberán explorar la posibilidad de degradar AMPA dentro de este grupo u otros, debido que la presencia de este metabolito también contamina el ambiente (la Cecilia y Maggi, 2018). La completa degradación del AMPA ocurre a través de la vía de la C-P liasa por lo que la relación de los genes involucrados con las concentraciones en el suelo de GP y AMPA son determinantes para disminuir la contaminación ambiental producida por las aplicaciones del herbicida y sus efectos.

Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas

Conclusiones

El presente trabajo de tesis permitió estudiar la disipación del glifosato en el suelo bajo condiciones de campo y se relacionó con la dinámica de las poblaciones microbianas para realizar asociaciones con los procesos de degradación del herbicida.

La degradación del GP en el suelo no estuvo condicionada por el historial de uso del herbicida y estuvo relacionada con la biodisponibilidad del compuesto. Las diferencias en las tasas de disipación y los tiempos de vida media del GP estuvieron relacionadas con su capacidad de adsorber la molécula, dada por las propiedades edáficas. El suelo sin historial mostró mayor coeficiente de adsorción y tuvo una tasa menor de disipación en comparación con los suelos agrícolas con 5 y más de 10 años de historial de uso, que tuvieron coeficientes más bajos y tasas mayores.

Los coeficientes de adsorción, calculados mediante funciones empíricas de pedotransferencia, se correlacionaron con las concentraciones residuales de GP y AMPA de estos suelos y otros 16 del sudeste bonaerense, independientemente de las dosis del herbicida usadas y los tiempos transcurridos desde la aplicación. Este aspecto constituye una herramienta que pudiera usarse en esta región para predecir la persistencia de ambas moléculas en el suelo.

Los cambios observados en las poblaciones microbianas de estos suelos no pudieron atribuirse a la aplicación del GP y las diferencias en su estructura estuvieron fuertemente correlacionadas con las propiedades edáficas: contenido de MO, CIC, pH y contenido de arcilla.

Partiendo del hecho que el grado de exposición previa del suelo al GP tuvo poco efecto en la cinética de biodegradación y en la dinámica de las poblaciones microbianas, y que se obtuvo una asociación significativa entre el GP residual y los estimadores del grado de adsorción del GP al suelo, nosotros concluimos que la biodisponibilidad fue el principal factor que afectó el grado de disipación total del GP en el suelo.

La red de asociaciones bacterianas se perturbó con la aplicación del GP. En el suelo sin historial de uso del herbicida la afectación fue drástica después de una única aplicación, mientras que en los suelos con historial se observó una disminución menos pronunciada producto de un debilitamiento de las interacciones, debido probablemente al uso prolongado del GP.

Se observó un aumento significativo en la abundancia de Bacteroidetes relacionado con el proceso de disipación del compuesto en el suelo sin historial de uso del GP, posterior a la aplicación del herbicida. No obstante, la falta de respuesta ante la aplicación en todos los suelos en general, reafirman que la degradación del herbicida es llevado a cabo por variados grupos bacterianos.

Se diseñó un par de cebadores para cuantificar la abundancia del gen de la glicina oxidasa (*thiO*) de especies de *Bradyrhizobium* presentes en el suelo, mediante ensayos de q-PCR, usando como referencia el gen *rpoB* descrito para este género. De esta manera se pudieron identificar genotipos potencialmente relacionados con la degradación del herbicida, provenientes del suelo sin historial de uso (P0). Este ensayo contribuye al conocimiento sobre el papel del género en la degradación de contaminantes y al aporte adicional que puede sumar a sus funciones ecosistémicas más conocidas y utilizadas en la producción agrícola.

Perspectivas

En base a los resultados obtenidos en esta tesis sería interesante probar las funciones empíricas de pedotransferencia utilizadas en este estudio en otros suelos pampeanos para determinar su alcance en este ambiente. En la medida en que se vayan generando datos ambientales de las concentraciones de glifosato y AMPA se podrá verificar la utilidad de estas estimaciones para predecir la persistencia del herbicida en el suelo y minimizar la contaminación de otras matrices ambientales.

En cuanto a favorecer los procesos de biodegradación sería necesario determinar el impacto en las funciones de las comunidades microbianas del suelo que tienen las perturbaciones de las interacciones bacterianas que produjo la aplicación del glifosato, observadas en este trabajo. En este sentido, es de interés determinar el papel de Bacteroidetes en la biodegradación y evaluar sus funciones en suelos con diferente contenido de MO.

Es recomendable ampliar el ensayo de cuantificación del gen *thiO* de *Bradyrhizobium* en suelo a determinaciones de niveles de expresión de este gen en la comunidad para establecer relaciones funcionales con la formación de AMPA. Sería interesante explorar además su posibilidad de usar la ruta metabólica de la sarcosina y de degradación del AMPA.

Publicaciones generadas por esta Tesis

- Revistas con referato:

Keren Hernández Guijarro, Virginia Aparicio, Eduardo De Gerónimo, Martin Castellote, Eva Figuerola, José L. Costa, Leonardo Erijman. 2018. Soil microbial communities and glyphosate decay in soils with different herbicide application history. *Science of the Total Environment*, 634: 974-982.

- Eventos científicos:

- Congreso Nacional de Ecología y Biología de Suelos CONEBIOS III. Efecto de la aplicación de glifosato sobre la variabilidad de comunidades microbianas de un suelo argiudol de la provincia de Buenos Aires. Hernández Guijarro K, Aparicio V, de Gerónimo E, Covacevich F. 24 a 26 de abril, 2013. Río Cuarto, Córdoba.

- XXIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Aislamiento y caracterización de cepas del suelo degradadoras del herbicida glifosato. Hernández Guijarro, K., de Gerónimo E., Aparicio, V. Del 5 al 9 de mayo de 2014, Bahía Blanca.
 - XXV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Persistencia del herbicida Glifosato en suelos con diferentes tipos de manejo agrícola. Hernández Guijarro K, Aparicio VC, de Gerónimo E y Costa JL. 27 jun-1 jul 2016, Rio Cuarto.
 - IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Relación entre las comunidades bacterianas edáficas y la disipación del herbicida glifosato influenciada por el tipo de uso del suelo. Hernández Guijarro K, Aparicio VC, de Gerónimo E, Castellote M, Figuerola E, Costa JL, Erijman L. 11-13 abril 2018, Mar del Plata, Argentina.
- Secuencias genéticas publicadas en NCBI y SNDG

Secuencias genéticas de bacterias de suelos con diferente historial de aplicación de glifosato (PRJNA393173 en NCBI Sequence Read Archive: SRA), depositadas en el Sistema Nacional de Datos Genéticos (SNDG). Keren Hernández Guijarro & Martín Castellote, 2018.

Referencias

Albers C.N., Banta G.T., Hansen P.E., Jacobsen O.S. 2009. The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil – Comparing different soils and humic substances. *Environ. Pollut.* 157: 2865-2870.

Alexa E., Bragea M., Sumalan R., Lazureanu A., Negrea M., Iancu S. 2009. Dynamic of glyphosate mineralization in different soil types. *Rom. Agric. Res.* 26: 57-60.

Allegrini M., Zabaloy M.C., Gómez E.V. 2015. Ecotoxicological assessment of soil microbial community tolerance to glyphosate. *Sci. Total Environ.* 533: 60-68.

Allegrini M., Gomez E., Zabaloy M.C. 2017. Repeated glyphosate exposure induces shifts in nitrifying communities and metabolism of phenylpropanoids. *Soil Biol. Biochem.* 105: 206–215.

Al-Rajab A.J., Schiavon M. 2010. Degradation of ¹⁴C-glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in three agricultural soils. *J. Environ. Sci.* 22: 1374-1380.

Aparicio V.C., De Gerónimo E., Marino D., Primost J., Carriquiriborde P., Costa J.L. 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere.* 93: 1866-1873.

Araújo A.S.F., Monteiro R.T.R., Abarkeli R.B. 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere.* 52: 799-804.

Avontuur J.R., Palmer M., Beukes C.W., Chan W.Y., Coetzee M.P.A., Blom J., Stepkowski T., Kyrpides N.C., Woyke T., Shapiro N., Whitman W.B., Venter S.N., Steenkamp E.T. 2019. Genome-informed *Bradyrhizobium* taxonomy: where to from here? *Syst. Appl. Microbiol.* 42: 427-439.

- Baelum J., Nicolaisen M.H., Holben W.E., Strobel B.W., Sørensen J., Jacobsen C.S. 2008. Direct analysis of *tfdA* gene expression by indigenous bacteria in phenoxy acid amended agricultural soil. *Int. Soc. Microb. Ecol.* 2: 677-687.
- Balthazor T.M., Hallas L.E. 1986. Glyphosate degrading microorganisms from industrial activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 432-434.
- Bailey T.L., Bodén M., Buske F.A., Frith M., Grant C.E., Clementi L., Ren J., Li W.W., Noble W.S. 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* 37:202-208.
- Baker K.L., Marshall S., Nicol G.W., Campbell C.D., Nicollier G., Ricketts D., Killham K., Prosser J.I. 2010. Degradation of metalaxyl-M in contrasting soils is influenced more by differences in physicochemical characteristics than in microbial community composition after re-inoculation of sterilised soils. *Soil Biol. Biochem.* 42: 1123-1131.
- Battaglin W.A., Meyer M.T., Kuivila K.M., Dietze J.E. 2014. Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater and precipitation. *J. Am. Water Resour. As.* 50: 275-290.
- Bento C.P., Yang X., Gort G., Xue S., van Dam R., Zomer P., Molf H., Ritsema C.J., Geissen V. 2016. Persistence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in loess soil under different combinations of temperature, soil moisture and light/darkness. *Sci. Total Environ.* 572: 301-311.
- Bento C.P.M., Goossens D., Rezaei M., Riksen M., Mol H.G.J., Ritsema C.J., Geissen V. 2017. Glyphosate and AMPA distribution in wind-eroded sediment derived from loess soil. *Environ. Pollut.* 220: 1079-1089.
- Berg G., Smalla K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and

- function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68: 1-13.
- Binimelis R., Pengue W., Monterroso I. 2009. "Transgenic treadmill": Responses to the emergence and spread of glyphosate-resistant johnsongrass in Argentina. *Geoforum* 40: 623-633.
- Borggaard O.K., Gimsing A.L. 2008. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: A review. *Pest Manag. Sci.* 64: 441-456.
- Bray R.R., Kurtz L. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59: 39-45.
- Busse M.D., Ratcliff A.W., Shestak C.J., Powers R.F. 2001. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1777-1789.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Meth.* 7:335-336.
- CASAFE 2015: <http://www.casafe.org/pdf/2015/ESTADISTICAS/Informe-Mercado-Fitosanitario-2012.pdf>
- Cerdeira A.L., Duke S.O. 2006. The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: a review. *J. Environ. Qual.* 35: 1633-1658.
- Chang F.C., Simick M.F., Capel P.D. 2011. Occurrence and fate of the herbicide glyphosate

and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. *Environ. Toxicol. Chem.* 30: 548-555.

Chao A. 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.* 11: 265-270.

Chapman H.D. 1965. Cation exchange capacity. *Methods of Soil Analysis. Agronomy Series Number 9.* American Society of Agronomy, Madison, pp. 891–901.

Chen C.M., Ye Q.Z., Zhu Z.M., Wanner B.L., Walsh C.T. 1990. Molecular biology of carbon-phosphorus bond cleavage. Cloning and sequencing of the *phn* (*psiD*) genes involved in alkylphosphonate uptake and C-P lyase activity in *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 265: 4461-4471.

CONICET. 2009. Informe: Evaluación de la Información Científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Julio 2009. 133p. <http://www.fundacion-campo.org/userfiles/prensa/glifosatoinfoconicet09.pdf>

Cremers A., Laudelout H. 1966. Surface mobilities of cations in clays. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 30: 570-576.

Da Cruz L.H., Santana H., Zaia C.T.B.V., Zaia D.A.M. 2007. Adsorption of glyphosate on clays and soils from Paraná State: effect of pH and competitive adsorption of phosphate. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50: 385-394.

De Andrea M.M., Peres T.B., Luchini L.C., Barzarin S., Papini S., Matallo M.B., Savoy V.L. 2003. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 38:1329-1335.

De Gerónimo E., Aparicio V., Costa J.L. 2018. Glyphosate sorption to soils of Argentina.

- Estimation of affinity coefficient by pedotransfer function. *Geoderma* 322: 140-148.
- De Gerónimo E., Aparicio V., Barbaro S., Portocarrero R., Jaime S., Costa J.L. 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere*. 107: 423-431.
- Devers M., Soulas G., Martin-Laurent F. 2004. Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *J. Microbiol. Meth.* 56: 3-15.
- Dick R.E., Quinn J.P. 1995. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: 536 occurrence and pathways of degradation. *Appl. Microbiol. Biot.* 43: 545-550.
- Dill G.M. 2005. Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Manag. Sci.* 61: 219-224.
- Dollinger J., Dages C., Voltz M. 2015. Glyphosate sorption to soils and sediments predicted by pedotransfer functions. *Environ. Chem. Lett.* 13: 293-307.
- Druille M., Omacini M., Golluscio R.A., Cabello M.N. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi are directly and indirectly affected by glyphosate application. *Appl. Soil Ecol.* 72: 143-149.
- Echeverría H.E., García F.O. 1998. Guía para la fertilización fosfatada de trigo, maíz, girasol y soja. INTA Estación Experimental Agropecuaria Balcarce. Boletín Técnico N° 149. 18 p.
- Ermakova I.T., Kiseleva N.I., Shushkova T., Zharikov M., Zharikov G.A., Leontievsky A.A. 2010. Bioremediation of glyphosate contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biot.* 88: 585-594.
- Errey J.C., Blanchard J.S. 2006. Functional annotation and kinetic characterization of *phnO* from *Salmonella enterica*. *Biochemistry* 45: 3033-3039.
- Fan J., Yang G., Zhao H., Shi G., Geng Y., Hou T., Tao K. 2012. Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58: 263-271.

Fernandez A.L., Sheaffer C.C., Wyse D.L., Staley C., Gould T.J., Sadowsky M.J. 2016. Structure of bacterial communities in soil following cover crop and organic fertilizer incorporation. *Appl. Microbiol. Biot.* 100: 9331-9341.

Fierer N., Lauber C.L., Ramirez K.S., Zaneveld J., Bradford M.A., Knight R. 2012. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *ISME J.* 6: 1007-1017.

Galantini J., Rosell R. 2006. Long-term fertilization effects on soil organic matter quality and dynamics under different production systems in semiarid Pampean soils. *Soil Till. Res.* 87: 72-79.

Gard J.K., Feng P.C., Hutton W.C. 1997. Nuclear magnetic resonance time course studies of glyphosate metabolism by microbial soil isolates. *Xenobiotica.* 27: 6336-6344.

Gee G.W., Bauder J.W. 1986. Particle size analysis. In: Klute, A. (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and Mineralogical Methods*, second ed. Agronomy, Madison.

Gimsing A.L., Borggaard O.K., 2002. Competitive adsorption and desorption of glyphosate and phosphate on clay silicates and oxides. *Clay Miner.* 37: 509-515.

Gimsing A.L., Borggaard O.K., Jacobsen O.S., Aamand J., Sørensen J. 2004. Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralisation in Danish surface soils. *Appl Soil Ecol.* 27: 233-242.

Girvan M.S., Bullimore J., Pretty J.N., Osborn A.M., Ball A.S. 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1800-1809.

Gómez Ortiz A.M., Okada E., Bedmar F., Costa J.L. 2017. Sorption and desorption of

glyphosate in mollisols and ultisols soils of Argentina. *Environ. Toxicol. Chem.* 36: 2587-2592.

Gómez E., Ferreras L., Lovotti L., Fernandez E. 2009. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. *Eur. J. Soil Biol.* 45: 163-167.

Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate Maximum-Likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59: 307-321.

Hadi F., Mousavi A., Noghabi K.A., Tabar H.G., Salmanian A.H. 2013. New bacterial strain of the genus *Ochrobactrum* with glyphosate-degrading activity. *J Environ Sci Health B.* 48: 208-213.

Hamady M., Lozupone C., Knight R. 2010. FastUniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChipdata. *ISME J.* 4: 17-27.

Han H., Zhu B., Fu X., You S., Wang B., Li Z., Zhao W., Peng R., Yao Q. 2015. Overexpression of D-amino acid oxidase from *Bradyrhizobium japonicum*, enhances resistance to glyphosate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 34: 2043-2051.

Haney R.L., Senseman S.A., Hons F.M. 2002. Effect of roundup ultra on microbial activity and biomass from selected soils. *J. Environ. Qual.* 31: 730-735.

Hassan-Abdallah A., Zhao G., Eschenbrenner M., Chen Z.W., Mathews F.S., Jorns M.S. 2005. Cloning, expression and crystallization of heterotetrameric sarcosine oxidase from *Pseudomonas maltophilia*. *Protein Expr. Purif.* 43: 33-43.

- Hayes V.E.A., Ternan N.G., McMullan G. 2000. Organophosphate metabolism by a moderately halophilic bacterial isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* 186: 171-175.
- Henderson S.L., Dandie C.E., Patten C.L., Zebarth B.J., Burton D.L., Trevors J.T., Goyer C.M. 2010. Changes in denitrifier abundance, denitrification gene mRNA levels, nitrous oxide emissions and denitrification in anoxic soil microcosms amended with glucose and plant residues. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 2155-2164.
- Hernández Guijarro K., Covacevich F., Aparicio V.A., De Gerónimo E. 2018. Bacterias nativas del suelo con potencial para la degradación de glifosato y promoción del crecimiento vegetal. *Ciencia del Suelo.* 36: 105-116.
- Hibbing M.E., Fuqua C., Parsek M.R., Peterson S.B. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Rev. Microbiol.* 8: 15-25.
- Hove-Jensen B., Zechel D.L., Jochimsen B. 2014. Utilization of glyphosate as phosphate source: Biochemistry and genetics of bacterial carbon-phosphorus lyase. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 78: 176-197.
- Hungria M., Menna P., Delamuta J.R.M. 2015. *Bradyrhizobium*, the ancestor of all rhizobia: phylogeny of housekeeping and nitrogen-fixation genes. *Biological Nitrogen Fixation* 2: 191-202.
- Huntscha S., Stravs M.A., Bühlmann A., Ahrens A.H., Frey J.E., Pomati F., Hollender J., Buerge I.J., Balmer M.E., Poiger T. 2018. Seasonal dynamics of glyphosate and AMPA in Lake Greifensee: Rapid microbial degradation in the Epilimnion during summer. *Environ. Sci. Technol.* 52: 4641-4649.
- IUSS Working Group WRB, 2007. World Reference Base for Soil Resources. World Soil Resources Report n. 1003. FAO, Rome (128p).
- Iyer R., Iken B., Damania A., Krieger J. 2018. Whole genome analysis of six

organophosphate-degrading rhizobacteria reveals putative agrochemical degradation enzymes with broad substrate specificity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25: 13660-13675.

Jacob G.S., Garbow J.R., Hallas L.E., Kimack N.M., Kishore G.M., Schaefer J. 1988. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. *App. Environ. Microbiol.* 54: 2953-2958.

Jacobsen C.S., Hjelmsø M. 2014. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Curr. Opin. Biotech.* 27: 15-20.

James T.K., Rahman A., Trolove M.R., Parker M.D. 2010. Enhanced degradation of atrazine in soils with a history of repeated use. *Seventeenth Australasian Weeds Conference*, pp. 24–27.

Jones F., Clark I., King R., Shaw L., Woodward M., Hirsch P. 2016. Novel European free-living, non-diazotrophic *Bradyrhizobium* isolates from contrasting soils that lack nodulation and nitrogen fixation genes - A genome comparison. *Sci. Rep.* 6: 25858.

Kaufman D.D., Katan J., Edwards D.F., Jordan E.G. 1985. Microbial adaptation and metabolism of pesticides. In: Hilton, J.L. (Ed.), *Agriculture Chemicals of the Future*. Rowman and Allanheld, Totowa, USA.

Kepler R.M., Schmidt D.J.E., Yarwood S.A., Reddy K.N., Duke S.O., Bradley CA., Williams M.M., Buyer J., Cavigelli M.A., Maul J.E. 2018. Soil microbial communities in diverse agroecosystems exposed to glyphosate. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/484055>

Kjær J., Ernsten V., Jacobsen O.H., Hansen N., de Jonge L.W., Olsen P. 2011. Transport modes and pathways of the strongly sorbing pesticides glyphosate and pendimethalin through structured drained soils. *Chemosphere* 84: 471-479.

- Kleffman Group. 2013. Mercado Argentino de fitosanitarios 2012. <http://www.casafe.org>
- Kryuchkova Y.V., Burygin G.L., Gogoleva N.E., Gogolev Y.V., Chernyshova M.P., Makarov O.E., Fedorov E.E., Turkovskaya O.V. 2014. Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. *Microbiol Res.* 169: 99-105.
- Krzysko-Lupicka T., Stroff W., Kubs K., Skorupa M., Wieczorek P., Lejczak B., Kafarski P. 1997. The ability of soil borne fungi to degrade organophosphonate carbon-to-phosphorus bonds. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 549-552.
- Krzywinski M., Schein J., Birol I., Connors J., Gascoyne R., Horsman D., Jones S.J., Marra M.A. 2009. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* 19: 1639-1645.
- La Cecilia D., Maggi F. 2018. Analysis of glyphosate degradation in a soil microcosm. *Environ. Pollut.* 233: 201-207.
- Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (Eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester, 115-175 p.
- Lane M., Lorenz N., Saxena J., Ramsier C., Dick R.P. 2012. The effect of glyphosate on soil microbial activity, microbial community structure, and soil potassium. *Pedobiologia.* 55: 335-342.
- Lauber C.L., Strickland M.S., Bradford M.A., Fierer N. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol. Biochem.* 40: 2407-2415.
- Li F., Chen L., Zhang J., Yin J., Huang S. 2017. Bacterial community structure after long term organic and inorganic fertilization reveals important associations between soil nutrients and specific taxa involved in nutrient transformations. *Front. Microbiol.* 8: 187.

- Liu C.M., McLean P.A., Sookdeo C.C., Cannon F.C. 1991. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family *Rhizobiaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1799-1800.
- López S.L., Aiassa D., Benitez-Leite S., Lajmanovich R., Manas F., Poletta G., Sanchez N., Simoniello M.F., Carrasco A.E. 2012. Pesticides Used in South-American GMO-Based Agriculture: A Review of their Effects on Humans and Animal Models. *Advances in Molecular Toxicology*, Vol.6 (Chapter 2, 41-75 p).
- Ludwig J., Reynolds J. 1988. *Statistical Ecology: A Primer on Method and Computing*. John Wiley and Sons, New York.
- Lupi L., Miglioranza K.S.B, Aparicio V.C., Marino D., Bedmar F., Wunderlin D.A. 2015. Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Sci. Total Environ.* 536: 687-694.
- Mamy L., Barriuso E., Gabrielle B. 2016. Glyphosate fate in soils when arriving in plant residues. *Chemosphere.* 154: 425-433.
- Meskys R., Harris R.J., Casaite V., Basran J., Scrutton N.S. 2001. Organization of the genes involved in dimethylglycine and sarcosine degradation in *Arthrobacter* spp.: implications for glycine betaine catabolism. *Eur. J. Biochem.* 268: 3390-3398.
- Moore I.K., Braymer H.D., Larson A.D. 1983. Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilises the phosphonate herbicide glyphosate. *Appl Environ. Microbiol.* 46: 316-320.
- Murphy D.V., Cookson F.W.R., Braimbridge M., Marschner P., Jones D.L., Stockdale E.A., Abbott L.K. 2011. Relationships between soil organic matter and the soil microbial biomass (size, functional diversity, and community structure) in crop and pasture systems in a semi-arid environment. *Soil Res.* 49: 582-594.

- Muyzer G., Dewaal E.C., Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Myers J.P., Antoniou M.N., Blumberg B., Carroll L., Colborn T., Everett L.G., Hansen M., Landrigan P.J., Lanphear B.P., Mesnage R., Vandenberg L.N., vom Saal F.S., Welshons W.V., Benbrook C.M. 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ. Health* 15:19.
- Nelson D.W., Sommers L.E. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. *Am. Soc. Agron.* 9: 539-579.
- Newman M.M., Hoilett N., Lorenz N., Dick R.P., Liles M.R., Ramsier C., Kloepper J.W. 2016a. Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. *Sci. Total Environ.* 543: 155-160.
- Newman M.M., Lorenz N., Hoilett N., Lee N.R., Dick R.P., Liles M.R., Ramsier C., Kloepper J.W. 2016b. Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. *Sci. Total Environ.* 553: 32-41.
- Obojska A., Lejczak B., Kubrak M. 1999. Degradation of phosphonates by *Streptomyces* isolates. *Appl. Microbiol. Biot.* 51: 872-876.
- Obojska A., Ternana N.G., Lejczak B., Kafarski P., McMullan P. 2002. Organophosphate utilization by the thermophile *Geobacillus caldoxylosilyticus* T20. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2081-2084.
- Okada E., Costa J.L., Bedmar F. 2016. Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage. *Geoderma.* 263: 78-85.
- Okada E., Costa J.L., Bedmar F. 2017. Glyphosate dissipation in different soils under no till

and conventional tillage. *Pedosphere*: [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60430-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60430-2)

Okada E., Pérez D., De Gerónimo E., Aparicio V., Massone H., Costa J.L. 2018. Non-point source pollution of glyphosate and AMPA in a rural basin from the southeast Pampas, Argentina. *Environ. Sci. Pollut. R.* 25: 15120-15132.

Ololade I.A., Oladoja N.A., Oloye F.F., Alomaja F., Akerele D.D., Iwaye J., Aikpokpodion P. 2014. Sorption of glyphosate on soil components: the roles of metal oxides and organic materials. *Soil Sediment Contam.* 23: 571-585.

Paganelli A., Gnazzo V., Acosta H., López S.L., Carrasco A.E. 2010. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chem. Res. Toxicol.* 23: 1586-1595.

Pedotti M., Rosini E., Molla G., Moschetti T., Savino C., Vallone B., Pollegioni L. 2009. Glyphosate resistance by engineering the flavoenzyme glycine oxidase. *J. Biol. Chem.* 284: 36415-36423.

Penaloza-Vazquez A., Mena G.L., Herrera-Estrella L., Bailey A.M. 1994. Cloning and sequencing of the genes involved in glyphosate utilization by *Pseudomonas pseudomallei*. *Appl Environ. Microbiol.* 61: 538-543.

Perticari A., Parra R., Balatti P., Fiqueni M., Rodriguez Caceres E. 1996. Selección de cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* y *Sinorhizobium fredii* para la inoculación de soja, p 103–104. Memorias de la XVIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología, 23 al 27 de septiembre 1996, Santa Cruz de La Sierra, Bolivia.

Peruzzo P.J., Porta A.A., Ronco A.E. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* 156: 61-66.

- Pipke R., Amrhein N. 1988. Degradation of the phosphonate herbicide Glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1293-1296.
- Prata F., Camponez V., Lavorenti A., Tornisielo V.L., Borges J. 2003. Glyphosate sorption and desorption in soils with distinct phosphorous levels. *Sci. Agr.* 60: 175-180.
- Primost J.E., Marino D.J.G., Aparicio V.C., Costa J.L., Carriquiriborde P. 2017. Glyphosate and AMPA, “pseudo-persistent” pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environ. Pollut.* 229: 771-779.
- R Core Team, 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria URL. <https://www.R-project.org/>.
- Roberts T.R., Hutson D.H., Lee P.W., Nicholls P.H., Plimmer J.R. 1998. Metabolic pathways of agrochemicals. Part 1: Herbicides and plant growth regulators. London: The Royal Society of Chemistry, p.386-400.
- Rörig M.L. 2012. Estudio de los cambios poblacionales de microorganismos del suelo producidos por el herbicida glifosato. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Rueppel M.L., Brightwell B.B., Schaefer J., Marvel J.T. 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *J. Agr. Food Chem.* 25: 517-528.
- Sainz Rozas H.R., Echeverría H.E., Angelini H.P. 2011. Niveles de materia orgánica y pH en suelos agrícolas de la Región Pampeana y Extrapampeana. *Ciencia del Suelo.* 29: 29-37.
- Saleh-Lakha S., Miller M., Campbell R.G., Schneider K., Elahimanesh P., Hart M.M., Trevors J.T. 2005. Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. *J. Microbiol. Meth.* 63: 1-19.
- Saleh-Lakh S., Shannon K.E., Goyer C., Trevors J.T. 2011. Challenges in quantifying

microbial gene expression in soil using quantitative reverse transcription real-time PCR. *J. Microbiol. Meth.* 85: 239-243.

Sambrook J., Russell D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (3rd Ed.), (pp. 1.59-1.61). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SAyDS (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable). 2008. El avance de la frontera agropecuaria y sus consecuencias. Subsecretaría de planificación y política ambiental. Dirección Nacional de Ordenamiento Ambiental y Conservación de la Biodiversidad. 12 p. www.ambiente.gov.ar/archivos/web/File/032808_avance_soja.pdf

Setälä H., Berg M.P., Jones, T.H. 2005. Trophic structure and functional redundancy in soil communities. In R. D. Bardgett, M. B. Usher, & D. W. Hopkins (Eds.), *Biological Diversity and Function in Soil* (pp. 236-249). Cambridge: Cambridge University Press.

Shannon K.E., Saleh-Lakha S., Burton D.L., Zebarth B.J., Goyer C., Trevors J.T. 2011. Effect of nitrate and glucose addition on denitrification and nitric oxide reductase (*cnorB*) gene abundance and mRNA levels in *Pseudomonas mandelii* inoculated into anoxic soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 100:183-195.

Schlatter D.C., Yin C., Hulbert S., Burke I., Paulitz T. 2017. Impacts of repeated glyphosate use on wheat-associated bacteria are small and depend on glyphosate use history. *Appl. Environ. Microbiol.* 83: e01354-17.

Schnell S., Mendoza C. 1997. Closed form solution for time-dependent enzyme kinetics. *J. Theor. Biol.* 187: 207-212.

Schneijderberg M., Schmitz L., Cheng X., Polman S., Franken C., Geurts R., Bisseling T. 2018. A genetically and functionally diverse group of non-diazotrophic *Bradyrhizobium* spp. colonizes the root endophytic compartment of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 18: 61.

Schuette J. 1998. Environmental fate of glyphosate. *Environmental monitoring and pest*

- management, Department of Pesticide Regulation. Sacramento, CA 95824-5624. 13p.
- Schütte U.M.E., Abdo Z., Bent S.J., Shyu C., Williams C.J., Pierson J.D., Forney L.J. 2008. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 365e380.
- Silva V., Montanarella L., Jones A., Fernández-Ugalde O., Mol H.G.J., Coen M., Ritsema C.J., Geissen V. 2018. Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural top soils of the European Union. *Sci. Total Environ.* 621: 1352-1359.
- Singh B.K. 2009. Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 156-164.
- Singh B.K., Walker A. 2006. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 428-471.
- Sørensen S.R., Schultz A., Jacobsen O.S., Aamand J. 2006. Sorption, desorption and mineralisation of the herbicides glyphosate and MCPA in samples from two Danish soil and subsurface profiles. *Environ. Pollut.* 141: 184-194.
- Sprankle P., Meggitt W.F., Penner D. 1975. Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Sci.* 23: 229-234.
- Springett J.A., Gray R.A.J. 1992. Effect of repeated low doses of biocides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa* in laboratory culture. *Soil Biol. Biochem.* 24: 1739-1744.
- Stepkowski T., Czaplinska M., Miedzinska K., Moulin L. 2003. The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 483-494.

- Sviridov A.V., Shushkova T.V., Zelenkova N.F., Vinokurova N.G., Morgunov I.G., Ermakova I.T., Leontievsky A.A. 2012. Distribution of glyphosate and methylphosphonate catabolism systems in soil bacteria *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93: 787-796.
- Sviridov A.V., Shushkova T.V., Ermakova I.T., Ivanova E.V., Epiktetov D.O., Leontievsky A.A. 2015. Microbial degradation of glyphosate herbicides (review). Appl. Biochem. Microbiol. 51: 188-195.
- Sviridov A.V., Zelenkova N.F., Vinokurova N.G., Ermakova I.T., Leontievsky A.A. 2011. New approaches to identification and activity estimation of glyphosate degradation enzymes. Biochemistry 76: 880-887.
- Székács A., Darvas B. 2012. Forty years with glyphosate. In: Hasaneen, M.N.A.E.-G. (Ed.), Herbicides –Properties, Synthesis and Control of Weeds. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 247–284.
- Ternana N.G., McMullan G. 2000. The utilization of 4-aminobutylphosphonate as sole nitrogen source by a strain of *Kluyveromyces fragilis*. FEMS Microbiol. Lett. 184: 237-240.
- Thiour-Mauprivez C., Martin-Laurent F., Calvayrac C., Barthelmebs L. 2019. Effects of herbicide on non-target microorganisms: Towards a new class of biomarkers? Sci. Total Environ. 684: 314-325.
- Todorovic G.R., Rampazzo N., Mentler A., Blum W.E., Eder A., Strauss P. 2014. Influence of soil tillage and erosion on the dispersion of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in agricultural soils. Int. Agrophys. 28: 93-100.
- Tomlin C. 2000. The pesticide manual. 12th edn. BCPC. Publications, Surrey, UK.
- Torsvik V., Daae F.L., Sandaa R.A., Øvreås L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Curr. Opin. Microbiol. 5: 240-245.

- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 1;40(15):e115.
- VanInsberghe D., Maas K.R., Cardenas E., Strachan C.R., Hallam S.J., Mohn W.W. 2015. Non-symbiotic *Bradyrhizobium* ecotypes dominate North American forest soils. *The ISME Journal*, 1–7.
- Veiga F., Zapata J.M., Marcos M.L.F., Alvarez E. 2001. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *Sci. Total Environ.* 271: 135-144.
- Vinther F.P., Brinch U.C., Elsgaard L., Fredslund L., Iversen B.V., Torp S., Jacobsen C.S. 2008. Field-scale variation in microbial activity and soil properties in relation to mineralization and sorption of pesticides in a sandy soil. *J. Environ. Qual.* 37: 1710-1718.
- Walkey A. 1947. A critical examination of rapid method for determining organic carbon in soils- effect of variations in digestion condition of an inorganic soil constituents. *Soil Sci.* 63: 251-264.
- Wang S., Seiwert B., Kästner M., Miltner A., Schäffer A., Reemtsma T., Yang Q., Nowak K.M. 2016. (Bio)degradation of glyphosate in water-sediment microcosms - a stable isotope co-labeling approach. *Water Res.* 99: 91-100.
- Wang Y., Shimodaira J., Miyasaka T., Morimoto S., Oomori T., Ogawam N., Fukuda M., Fujii T. 2008. Detection of bphAa gene expression of *Rhodococcus* sp. strain RHA1 in soil using a new method of RNA preparation from soil. *Biosci. Biotech. Biochem.* 72: 694-701.
- Weaver M.A., Krutz L.J., Zablutowicz R.M., Reddy K.N. 2007. Effects of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Mississippi soil. *Pest Manag. Sci.* 63: 388-393.
- Weber J.B., Wilkerson G.G., Reinhardt C.F. 2004. Calculating pesticide sorption coefficients

(Kd) using selected soil properties. *Chemosphere* 55: 157-166.

Wertz S., Degrange V., Prosser J.I., Poly F., Commeaux C., Freitag T., Guillaumaud N., Le Roux X. 2006. Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environ. Microbiol.* 8: 2162-2169.

Widenfalk A., Bertilsson S., Sundh I., Goedkoop W. 2008. Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes - responses at various levels of microbial community organization. *Environ. Pollut.* 152: 576e584.

Yang X., Wang F., Bento C.P.M., Xue S., Gai L., van Dam R., Mol H., Ritsema C.J., Geissen V. 2015. Short-term transport of glyphosate with erosion in Chinese loess soil- a flume experiment. *Sci. Total Environ.* 512: 406-414.

Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 13: 134.

Zabaloy M.C., Gómez M.A. 2005. Diversity of rhizobia isolated from an agricultural soil in Argentina based on carbon utilization and effects of herbicides on growth. *Biol Fertil. Soils.* 42: 83-88

Zabaloy M.C., Gómez E., Garland J.L., Gómez M.A. 2012. Assessment of microbial community function and structure in soil microcosms exposed to glyphosate. *App. Soil Ecol.* 61: 333-339.

Zablotowicz R.M., Reddy K.N. 2004. Impact of Glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: A minireview. *J. Environ. Qual.* 33: 825-831.

Zboinska E., Lejczak B., Kafarski P. 1992. Organophosphonate utilization by the wildtype strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2993-2999.

- Zhan H., Feng Y., Fan X., Chen S. 2018. Recent advances in glyphosate biodegradation. *Appl. Microbiol. Biot.* 102: 5033-5043.
- Zhan T., Zhang K., Chen Y., Lin Y., Wu G., Zhang L., Yao P., Shao Z., Liu Z. 2013. Improving glyphosate oxidation activity of glycine oxidase from *Bacillus cereus* by directed evolution. *PLoS ONE* 8: e79175.
- Zhang K., Guo Y., Yao P., Lin Y., Kumar A., Liu Z., Wu G., Zhang L. 2016. Characterization and directed evolution of BliGO, a novel glycine oxidase from *Bacillus licheniformis*. *Enzyme Microb. Tech.* 85: 12-18.
- Zhang Y., Han S.W., Cox L.M., Li H. 2017. A multivariate distance-based analytic framework for microbial interdependence association test in longitudinal study. *Genet. Epidemiol.* 41: 769–778.
- Zhao M., Sun B., Wu L., Gao Q., Wang F., Wen C., Wang M., Liang Y., Hale L., Zhou J., Yang Y. 2016. Zonal soil type determines soil microbial responses to maize cropping and fertilization. *mSystems* 1: e00075-16.

Anexos

Anexo 1

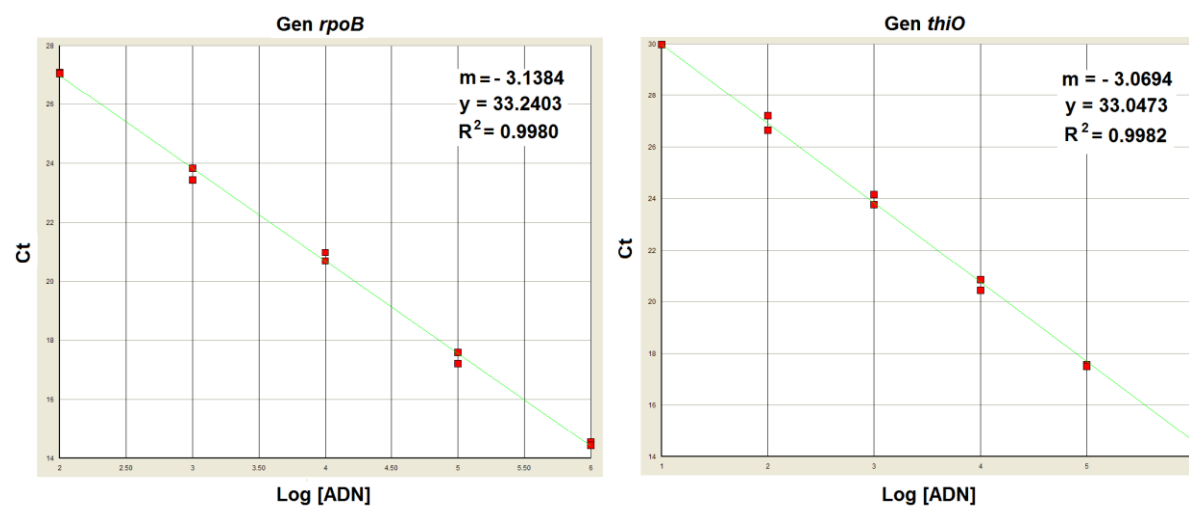


Figura I. Curvas estándares del ensayo de qPCR, a partir de diluciones de los productos de los genes *rpoB* (izquierda) y *thiO* (derecha) de *Bradyrhizobium japonicum* E109. Se grafica el logaritmo de la concentración de ADN vs los valores de Ct obtenidos. (m, y, R², corresponden a los valores de la pendiente, el intercepto del eje y y el ajuste de la recta, respectivamente).

Anexo 2

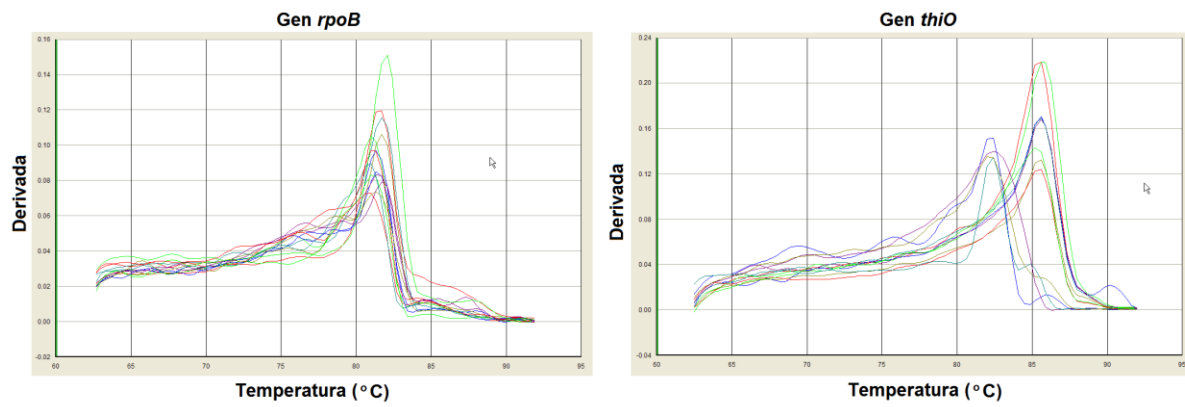


Figura II. Curvas de disociación de los productos de los genes *rpoB* (izquierda) y *thiO* (derecha) de *Bradyrhizobium* presentes en los suelos.

