

EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GLIFOSATO SOBRE LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO EN DISTINTAS PRÁCTICAS DE MANEJO

MARÍA ALEJANDRA STERREN^{1*}; SILVIA MERCEDES BENINTENDE¹;
WALTER UHRICH; PEDRO BARBAGELATA

Recibido: 18/2/2019
Recibido con revisiones: 29/4/2019
Aceptado: 29/4/2019

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto inmediato de la aplicación de glifosato (Gli.) sobre variables microbiológicas, en un suelo Vertisol y otro Molisol de Entre Ríos con diferentes prácticas de manejos. Para cada tipo de suelo, se trabajó con dos secuencias de cultivos: soja continua (pobre práctica de manejo) y Trigo/Soja-Maíz (buena práctica de manejo). Los tratamientos estuvieron definidos por el tipo de suelo, práctica de manejo y aplicación de Gli. Las variables evaluadas a los 2 días de aplicación fueron: residualidad de Gli. y ácido aminometilfosfónico (AMPA), C de biomasa microbiana (CBM), actividad respiratoria (AR), cociente metabólico (qCO_2) e hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA). Se realizó un análisis factorial para estudiar los efectos producidos por la aplicación de Gli. según tipo de suelo y práctica de manejo y sus interacciones, y una prueba T de Student para comparar la aplicación de Gli. A los 2 días, la residualidad de Gli. en las buenas prácticas fue menor respecto de las pobres prácticas y se asoció a mayores contenidos de AMPA. La AR durante las 48 h posteriores a la aplicación disminuyó cuando se aplicó Gli. excepto para el Vertisol con buenas prácticas. El CBM disminuyó significativamente en todos los suelos y manejos con aplicación de Gli., excepto en el Vertisol con pobres prácticas. Los mayores valores de qCO_2 fueron para el Molisol con pobres prácticas y Vertisol con buenas prácticas y se asociaron a menores contenidos de CBM lo que muestra que las poblaciones microbianas son diferentes al igual que su respuesta fisiológica a la aplicación de Gli. No se registraron efectos de Gli. sobre la FDA en los distintos suelos y manejos. Los resultados mostraron que en los suelos con buenas prácticas de manejo la desaparición de Gli. es más rápida que en los suelos con pobres prácticas de manejo.

Palabras claves: Variables biológicas- residualidad de glifosato-prácticas de manejo de suelos

EFFECT OF GLYPHOSATE APPLICATION ON SOIL MICROORGANISMS IN DIFFERENT SOIL MANAGEMENT PRACTICES

ABSTRACT

The objective was to evaluate the immediate effect of glyphosate (Gli) application on microbiological variables, in a Vertisol and a Molisol of Entre Ríos, under different land management. For each soil type, we worked with samples from areas with two crop sequences: continuous soybean (assumed as an area under poor management practices) and wheat / soybean-corn (assumed as an area under good management practices). Soil type, management practice and Gli application defined the treatments. Two days after Gli application we evaluated: residual Gli and aminomethylphosphonic acid (AMPA), C microbial biomass (CBM), respiratory activity (AR), metabolic quotient (qCO_2) and hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA). A factorial analysis was performed to study Gli application effects according to soil type and management practices and their interactions. Student's T test was used to compare Gli application treatments. Residual Gli after 2 days of application in good management practices, was lower comparing with poor management practices. Residual Gli was associated with the increase of AMPA contents. The AR, measured along 48 hours after herbicide application was inhibited when Gli was applied, except but for the Vertisol under good practices. CBM decreased significantly in treatments with Gli application, except in Vertisol with poor practices. The highest values of qCO_2 were for Molisol with poor practices and Vertisol with good practices and were associated with lower CBM contents, which shows that microbial populations are different as well as their physiological response to the application of Gli. No significant effects of Gli application were found on FDA in the different soils and managements. The results showed that in soils with good management practices the disappearance of Gli is faster than in soils with poor management practices.

Key words: Biological variables- residuality of glyphosate- soil management practices

¹ Cátedra de Microbiología Agrícola. Facultad de Ciencias Agropecuarias UNER.

* Autor de contacto: msterren@fca.uner.edu.a

INTRODUCCIÓN

La aplicación de glifosato (Gli.) ha aumentado en los últimos años debido a la intensificación de las secuencias de cultivos y a la utilización de cultivos resistentes a este herbicida. Para evaluar el impacto de los pesticidas en el ambiente y en particular su riesgo en los suelos, se han empleado mediciones físicas y químicas; pero hoy en día, el monitoreo biológico representa un aspecto cada vez más importante (Ramírez-Fuente & Trujillo-Tapia, 2012). El enfoque biológico “*in vivo*” (monitoreo en las plantas superiores o en las lombrices de tierra) y modelos “*in vitro*” (células animales y bacterias) se han utilizado como indicadores de calidad del suelo (Colombo *et al.*, 2013).

Los agroquímicos pueden afectar la dinámica de las poblaciones microbianas del suelo y por consiguiente las funciones que los mismos tienen en la degradación de restos vegetales, ciclaje de nutrientes, degradación de compuestos químicos, etc. Sin embargo, dichas comunidades microbianas responden de manera diferente a la presencia de múltiples fitosanitarios, y esto puede alterar la abundancia y el metabolismo de los microorganismos (Barros *et al.*, 2010). La aplicación de herbicidas puede inhibir (debido a sus toxicidades) o estimular los microorganismos del suelo cuando éstos los pueden utilizar como fuente de nutrientes (Mahía *et al.*, 2008).

La degradación del Gli. en el suelo depende principalmente de la actividad microbiana y enzimas intra y extracelulares. Las dos vías principales identificadas son: vía C-P liasa por enzimas que están relativamente extendidas entre las bacterias, liberando sarcosina y fosfatos; y la ruptura del enlace C-N por la enzima oxidasa, liberando ácido aminometilfosfónico (AMPA). Todos los productos de la degradación pueden ser utilizados por bacterias como fuente de C y energía (La Cecilia & Maggi, 2018) aunque la degradación de dichos compuestos puede realizarse a tasas más lentas.

Araújo *et al.* (2003) y Panettieri *et al.* (2013) encontraron que con dosis recomendadas de Gli. se estimuló la actividad enzimática medida como hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) y la beta-glucosidasa; y Dennis *et al.* (2018) no encontraron efecto sobre la diversidad y función de

bacterias, arqueas y nematodos con aplicaciones únicas de glifosato, glufosinato, paraquat y paraquat-diquat en dosis recomendadas. Bittencourt Barreto *et al.* (2008) y Dilly (2005) afirman que el cociente metabólico (qCO_2) puede ser utilizado para evaluar efectos ambientales y antropogénicos sobre la actividad microbiana y que los incrementos se encuentran asociados a condiciones desfavorables siendo un indicador de estrés.

Los fenómenos de adsorción-desorción también son claves en estos procesos, controlando la biodisponibilidad de los mismos para ser utilizados por los microorganismos. La velocidad de degradación será menor si la adsorción es muy intensa, ya que el compuesto estará menos disponible, y por consiguiente su vida media aumentará. El tiempo de permanencia de este herbicida en el suelo es función de su degradación microbiana pero también de su retención en el mismo, lo cual está directamente asociado a la composición mineralógica del suelo (óxidos y arcillas), los contenidos de materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, espacio poroso y distribución del tamaño de poros y el pH del suelo (Aparicio *et al.*, 2013; Okada *et al.*, 2016; La Cecilia & Maggi, 2018). El primer proceso que se produce cuando el herbicida llega al suelo es la adsorción, determinada por la composición mineralógica del mismo, seguida de una distribución del compuesto químico entre la fase adsorbida y la solución del suelo. Si disminuye la concentración en la solución del suelo, el Gli. podría desorberse para restituir dicho equilibrio (Maitre *et al.*, 2008).

Los suelos más representativos de la provincia de Entre Ríos son de los órdenes Molisol y Vertisol. En los suelos vertisoles de la provincia hay un alto contenido de arcillas montmorillonitas que podría incrementar la adsorción de Gli. o AMPA y reducir la biodisponibilidad a degradación en el corto plazo. Quinchiguano Haro (2012) menciona que este tipo de arcillas tienen una alta capacidad de intercambio catiónico (CIC), poco dependiente del pH, y poseen una gran capacidad de adsorción de Gli., más aún en presencia de iones de hierro y aluminio. También la materia orgánica, estudiada en forma aislada de las arcillas, podría adsorber igual cantidad de Gli. que las arcillas, dependiendo de su estructura química y tamaño molecular.

Sin embargo, al estudiar su efecto en conjunto con las arcillas, se ha establecido que la materia orgánica tiene menor influencia que las arcillas en la inactivación del Gli. (Hensley *et al.*, 1978).

Los efectos del Gli. sobre la actividad microbiana pueden diferir entre los suelos (Dennis *et al.*, 2018). Es así que la degradación de los agroquímicos depende tanto de las propiedades intrínsecas del mismo (por ejemplo, adsorción, solubilidad y persistencia) como de otros factores tales como las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo (por ejemplo, contenido orgánico, humedad, biomasa, conectividad de poros y pH) (Holland, 2004). Las prácticas de manejo de los suelos impactan sobre las características físico químicas, y son factores importantes a evaluar cuando se aplican agroquímicos, ya que pueden afectar la sorción del compuesto y así el transporte y el destino del mismo. También se podría pensar que mayores contenidos de materia orgánica, mejores condiciones de estructuración, humedad, porosidad, etc.; provocarían aumento de las poblaciones microbianas cuyas actividades degradativas darían como resultado una menor residualidad de Gli. en el suelo.

En Entre Ríos se han realizado estudios sobre el impacto de Gli. en la biota del suelo después de varios días de aplicación del herbicida; sin embargo, no se conocen estudios que muestren el efecto inmediato de su aplicación y durante las primeras horas en diferentes suelos con diferentes prácticas de manejo. El efecto germicida inmediato del herbicida sobre la biomasa microbiana podría derivar en cambios en la proporción de grupos funcionales a consecuencia del mismo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto inmediato durante las primeras horas de la aplicación de Gli. sobre algunas variables microbiológicas, en suelos Vertisoles y Molisoles de la provincia de Entre Ríos con diferentes prácticas de manejos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización y muestreo de suelos

Los sitios de muestreo seleccionados fueron sobre suelos: Molisol (31°51'4.99"S - 60°32'25.29"O) y Vertisol (31°49'59.53"S - 60°32'40.08"O). El suelo Molisol fue un Argiudol ácuico de la Serie Tezanos

Pinto, franco-arcillo-limoso, con un contenido de 27,6% de arcilla en el horizonte superficial. El suelo Vertisol fue un Cromuderte árgico de la Serie Febré, con un epipedón arcillo-limoso, con 40,2% arcilla y un horizonte B₂ argílico, arcilloso en la parte baja del gilgai, con caras de fricción ("slickensides") que, cuando seca se agrieta fuertemente en el B2t (Plan Mapa de Suelos, Convenio INTA - Gobierno de Entre Ríos, 1998).

Las muestras de suelo sobre las cuales se condujo el ensayo de laboratorio fueron tomadas de parcelas de la EEA INTA Paraná en las cuales se aplicaron dos secuencias de cultivos: Soja continua (asociada a una Pobre Práctica de Manejo: P) y secuencia Trigo/Soja-Maíz (asociada a una Buena Práctica de Manejo: B) que se realizan desde el año 2008 y que están expuestas a la aplicación de glifosato desde el inicio de los ensayos. El muestreo de suelos consistió en tomar muestras entre las líneas de cultivos, a una profundidad de 2,5 cm. Cada muestra estuvo compuesta por 20 submuestras. La manipulación y el almacenamiento de las muestras siguió la guía general para tratamiento de muestras de suelo para evaluaciones biológicas de calidad de suelos (ISO 1993). A partir de dichas muestras se condujo el ensayo en condiciones de laboratorio.

Para la caracterización de los suelos también se determinó el C orgánico (Corg.) y el N total, según el método de combustión descrito por Wang y Anderson (1998) con un LECO CHN-2000 analizador (LECO Corp., St. Joseph, MI USA), y el porcentaje de humedad asociado a cada manejo (**Tabla 1**).

Tabla 1. Caracterización inicial del suelo y sitios evaluados a 2,5 cm. de profundidad.

Table 2. Initial characterization of the soil and sites evaluated at 2.5 cm of depth.

Tratamientos	Corg. (%)	Ntot. (%)	Humedad (%)	pH
MB	3,86	0,213	27,6	5,9
MP	3,65	0,194	14,3	7,0
VB	3,60	0,214	18,2	7,2
VP	2,40	0,159	13,0	7,9

MB: suelo Molisol con buena práctica de manejo, MP: suelo Molisol con pobre práctica de manejo; VB: suelo Vertisol con buena práctica de manejo; VP: suelo Vertisol con pobre práctica de manejo.

Tratamientos

Los tratamientos estuvieron asociados al tipo de suelo, práctica de manejo y aplicación de Gli. Los tratamientos con aplicación de Gli. se realizaron a partir de una formulación comercial de Gli. al 66,2% PV de la sal potásica de N-fosfometil glicina (54% PV de equivalente ácido). La dosis de equivalente ácido (e.a.) al inicio de la incubación de las muestras fue de 3240 gr e.a./ha, similar a las dosis que usualmente se utilizan en condiciones de campo. Para el cálculo de la dosis a aplicar se tuvo en cuenta la densidad aparente de cada tipo de suelo (Molisol 1,25 Tn m⁻³, Vertisol 1,1 Tn m⁻³) y la profundidad del muestreo (2,5 cm). El Gli. se aplicó por pulverización y se diluyó en agua destilada para mejorar la distribución del herbicida en el suelo. La misma cantidad de agua fue asperjada para los tratamientos controles.

Los ocho tratamientos evaluados surgieron de la combinación entre tipo de suelo, prácticas de manejo y aplicación de Gli.: suelo Molisol con buena práctica de manejo sin aplicación (MB) y con aplicación de glifosato (MB-G), suelo Molisol con pobre práctica de manejo sin aplicación (MP) y con aplicación de glifosato (MP-G), suelo Vertisol con buena práctica de manejo sin aplicación (VB) y con aplicación de glifosato (VB-G), suelo Vertisol con pobre práctica de manejo sin aplicación (VP) y con aplicación de glifosato (VP-G). Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

Variables evaluadas

C de biomasa microbiana (CBM) por la técnica de fumigación-extracción (Vance *et al.*, 1987; ISO, 1997) con la posterior determinación del C mediante oxidación por combustión catalítica en analizador de C orgánico total (con analizador TOC-L Shimadzu).

Actividad Respiratoria (AR): se determinó por la medición de las condiciones hipobáricas ocasionadas en la atmósfera de un recipiente cerrado por el consumo de O₂ (Equipo Oxitop OC110).

Cociente metabólico (qCO₂): es la cantidad de CO₂ respirado por unidad de masa microbiana en un determinado tiempo (se expresa en microgramos C-CO₂ (microgramos de CBM gss h)⁻¹ (Anderson & Domsh, 2010).

Hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA): se estimó a través de la medición por espectrofotometría a 490 nm de la fluoresceína producida en las muestras de suelo que fueron tratadas con diacetato de fluoresceína por la técnica de Alef & Nannipieri (1995). Los resultados fueron expresados en microgramos de FDA por gramo de suelo seco por hora (μg de FDA gss⁻¹ h⁻¹).

La AR se midió a intervalos regulares hasta 48 hs. luego de la aplicación y las demás variables (CBM y FDA) a las 48 hs. después la aplicación del herbicida.

Residualidad de glifosato y ácido aminometilfosfónico (AMPA) en suelos: se determinó la concentración de Gli. y AMPA (μg kgss⁻¹) que había en cada muestra de suelo luego de 2 días de aplicada la dosis inicial. La determinación se realizó por cromatografía líquida y espectrometría de masas (Realizado en el Laboratorio de análisis de pesticidas. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce).

Análisis estadísticos

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico Infostat (Di Renzo *et al.*, 2018). Se analizó la normalidad de las variables por el test de Shapiro Wilks. La variable qCO₂ no presentó una distribución normal, por lo que para su estudio se la transformó aplicando Log₁₀-qCO₂.

Se realizó un análisis factorial para estudiar los efectos producidos por los factores: tipo de suelo, práctica de manejo y aplicación de Gli. y sus interacciones para las variables AR, CBM, qCO₂ y FDA. Para aquellos casos donde se obtuvo interacción positiva de los factores se aplicó, por separado según suelo y manejo, una prueba T de Student para comparar las medias ($\alpha \leq 0.05$).

RESULTADOS

Residualidad de Glifosato y ácido aminometilfosfónico (AMPA)

Dos días posteriores a la aplicación, la concentración residual de Gli. disminuyó un 64% para el MB y un 62% para el VB con respecto a la

dosis inicial aplicada. En los dos tipos de suelos con pobres prácticas de manejo la concentración residual de Gli. fue mayor: disminuyó un 52% en el MP y un 44% en el VP. Los contenidos de Gli fueron de $3,76 \mu\text{g kgss}^{-1}$ para MB, $5,01 \mu\text{g kgss}^{-1}$ para MP, $4,31 \mu\text{g kgss}^{-1}$ VB y $6,34 \mu\text{g kgss}^{-1}$ para VP. La mayor cantidad de AMPA residual encontrada estuvo asociada a la menor cantidad residual de Gli. (**Figura 1**).

La aplicación de Gli. fue analizada en función del efecto de cada tipo de suelo y práctica de manejo, sobre las variables AR, CBM, $q\text{CO}_2$ y FDA. Para indagar sobre la independencia de los factores implicados, se trabajó con los resultados del análisis factorial. Los p-valores del ANOVA se muestran en la **Tabla 2**.

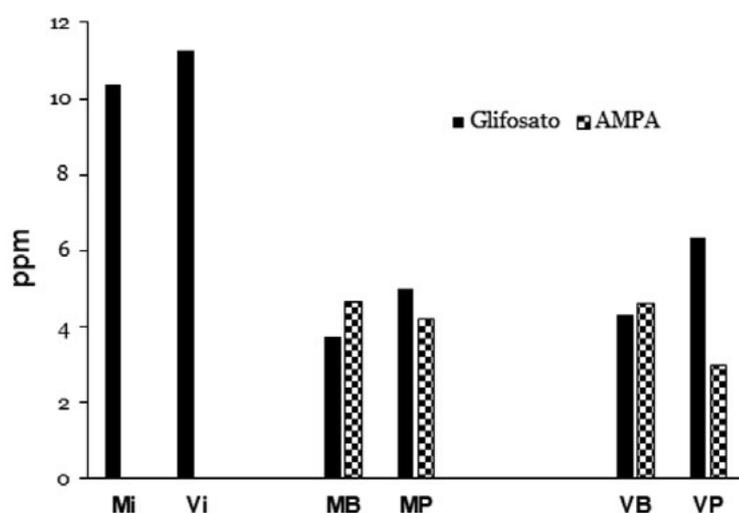


Figura 1. Cantidad residual de Glifosato (Gli.) y ácido aminometilfosfónico (AMPA) a los 2 días de la aplicación en: a) suelo Molisol con buena práctica de manejo (MB), b) suelo Molisol con pobre práctica de manejo (MP), c) suelo Vertisol con buena práctica de manejo (VB) y d) suelo Vertisol con pobre práctica de manejo (VP). Contenido de Gli. aplicado al suelo Molisol (Mi) y al Vertisol (Vi).

Figure 1. Residual amount of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) after 2 days of application in: a) Molisol soil with good management practice, b) Molisol soil with poor management practice, c) Vertisol soil with good management practice (VB) and d) Vertisol soil with poor management practice.

Tabla 2. Resultados del ANOVA (p-valor) del análisis factorial para las variables C de la Biomasa Microbiana (CBM), Actividad Respiratoria (AR), Cociente Metabólico ($q\text{CO}_2$) e Hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA).

Table 2. ANOVA results (p-value) of the factorial analysis for the variables C of the Microbial Biomass (CBM), Respiratory Activity (AR), Metabolic Quotient ($q\text{CO}_2$) and Hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA).

Fuente de Variación	p-valor			
	AR	CBM	$q\text{CO}_2$	FDA
Modelo	0,0111	<0,0001	0,0001	0,0161
SUELO	0,3595	<0,0001	0,0082	0,7653
MANEJO	0,1771	<0,0001	0,0306	0,0148
Aplicación	0,1431	0,9788	0,8825	0,003
SUELO*MANEJO	0,7784	0,0008	0,0787	0,5814
SUELO*Aplicación	0,0694	0,0013	0,6326	0,8538
MANEJO*Aplicación	0,108	0,0039	0,4477	0,1199
SUELO*MANEJO*Aplicación	0,0018	<0,0001	<0,0001	0,2513

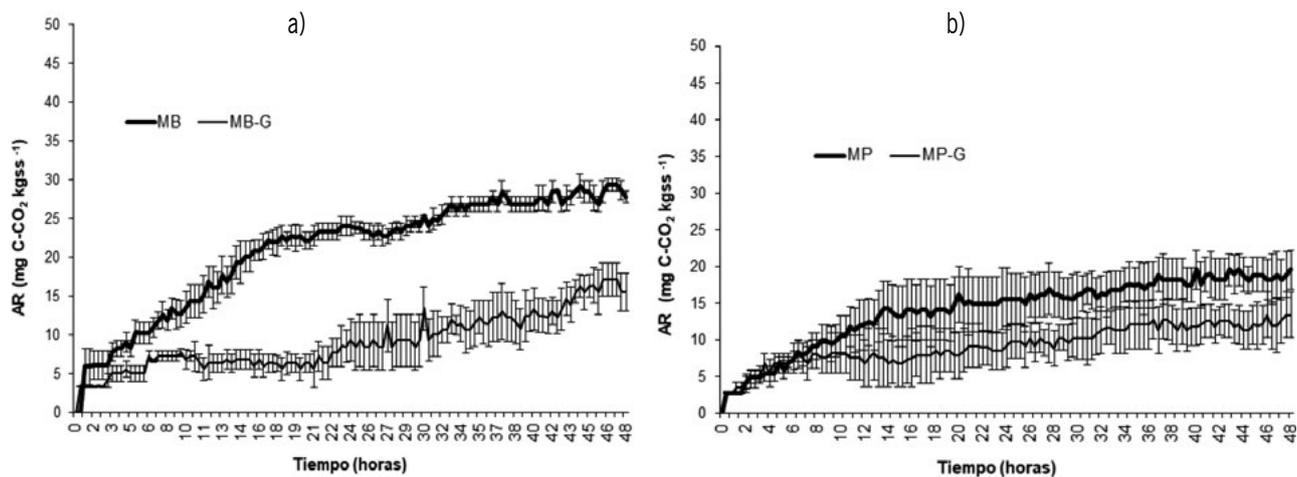


Figura 2. Actividad Respiratoria (AR) en suelo Molisol (M) con y sin aplicación de glifosato: a) en una buena práctica de manejo (B) y b) en una pobre práctica de manejo (P). Líneas verticales en la curva son barras de error con respecto a la media.

Figure 2. Respiratory Activity (AR) in Molisol Soil (M) with and without application of glyphosate: a) in good soil management practice (B) and b) in poor soil management practice (P). Vertical lines in the curve are error bars with respect to the mean.

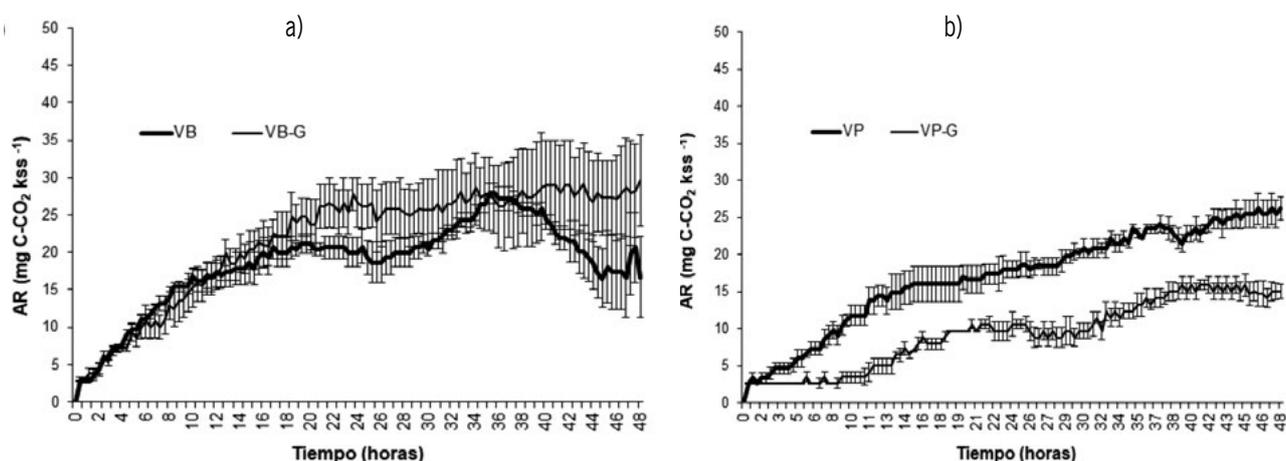


Figura 3. Actividad Respiratoria (AR) en Suelo Vertisol (V) con y sin aplicación de glifosato: a) en una buena práctica de manejo (B) y b) en una pobre práctica de manejo (P). Las líneas verticales en la curva son barras de error con respecto a la media.

Figure 3. Respiratory Activity (AR) in Vertisol Soil (M) with and without application of glyphosate: a) in good soil management practice (B) and b) in poor soil management practice (P). The vertical lines in the curve are error bars with respect to the mean.

Vertisol con pobres prácticas de manejo (**Figura 2a y 3b**). Las barras de error (desvío estándar con respecto a la media) graficadas en las curvas muestran la significación estadística. Contrariamente, en el Molisol con pobre práctica de manejo y en el Vertisol con buena práctica de manejo la variabilidad de los datos fue mayor y estuvieron más cercanos entre los tratamientos (**Figura 2b y 3a**).

C de la Biomasa Microbiana (CBM)

Esta variable mostró interacción significativa entre el tipo de suelo, práctica de manejo

y aplicación de Gli. (**Tabla 2**). Los contenidos de CBM en las buenas prácticas de manejo fueron mayores para ambos tipos de suelos: $665 \mu\text{gCBM gss}^{-1}$ para MB y $667 \mu\text{gCBM gss}^{-1}$ para VB en relación a las pobres prácticas de manejo: $509 \mu\text{gCBM gss}^{-1}$ para MP y $401 \mu\text{gCBM gss}^{-1}$ para VP. Luego de la aplicación de Gli. los valores de CBM disminuyeron significativamente un 34% en MB-G ($p < 0,0001$), 62% en MP-G ($p = 0,0001$) y 48% en VB-G ($p = 0,0001$) con respecto al suelo control y sin diferencias entre VP y VP-G ($p = 0,85$) (**Figura 4**).

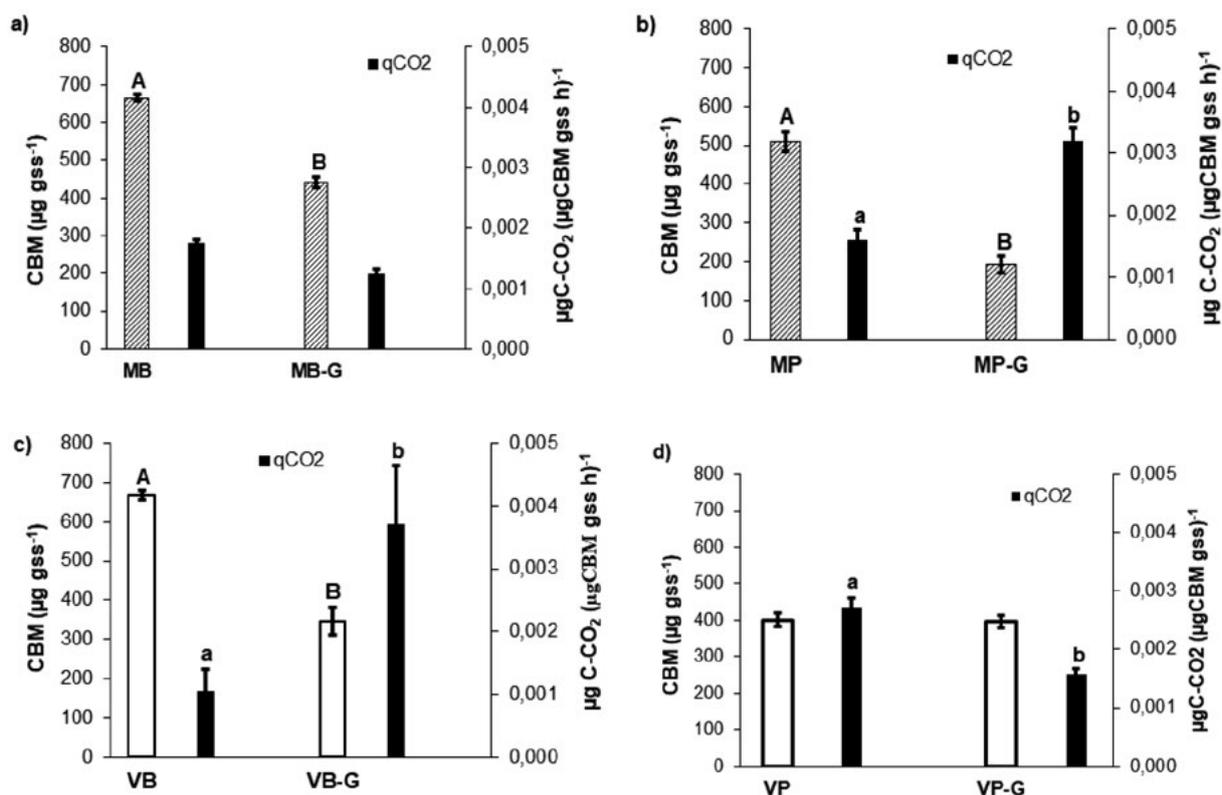


Figura 4. Carbono de la Biomasa Microbiana (CBM) y Cociente metabólico ($q\text{CO}_2$) en: a) suelo Molisol con buena práctica de manejo sin aplicación de glifosato (MB) y con aplicación de glifosato (MB-G); b) suelo Molisol con pobre práctica de manejo sin aplicación de glifosato (MP) y con aplicación de glifosato (MP-G), c) suelo Vertisol con buena práctica de manejo sin aplicación de glifosato (MB) y con aplicación de glifosato (MB-G) y d) suelo Vertisol con pobre práctica de manejo sin aplicación de glifosato (MP) y con aplicación de glifosato (MP-G).

Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0,05$) entre tratamientos para CBM y letras minúsculas indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0,05$) entre tratamientos para $q\text{CO}_2$.

Figure 4. Microbial Biomass Carbon (MBC) and Metabolic Ratio ($q\text{CO}_2$) in: a) Molisol soil with good soil management practice without application of glyphosate (MB) and with application of glyphosate (MB-G), b) Molisol soil with poor soil management practice without application of glyphosate (MP) and with application of glyphosate (MP-G), c) Vertisol soil with good soil management practice without application of glyphosate (MB) and with application of glyphosate (MB-G) and d) Vertisol soil with poor soil management practice without application of glyphosate (MP) and with application of glyphosate (MP-G). Different uppercase letters indicate significant difference ($\alpha \leq 0,05$) between treatments for CBM and lowercase letters indicate significant difference ($\alpha \leq 0,05$) between treatments for $q\text{CO}_2$.

Cociente metabólico ($q\text{CO}_2$)

El $q\text{CO}_2$ mostró interacción con los tres factores estudiados (**Tabla 2**). Los comportamientos fueron diferentes en cada tipo de suelo y práctica de manejo, y las diferencias entre tratamientos se observaron en el suelo Molisol con pobres prácticas de manejo ($p=0,0044$) y en ambas prácticas de manejo para el suelo Vertisol ($p=0,0023$ en buena práctica de manejo y $p=0,0004$ en pobre práctica de manejo). Los mayores valores encontrados de $q\text{CO}_2$ fueron de $0,0032 \mu\text{gC-CO}_2/(\mu\text{g CBM. gss h})^{-1}$

para MP-G y de $0,0037 \mu\text{gC-CO}_2/(\mu\text{g de CBM. gss h})^{-1}$ para VB-G (**Figura 4b y 4c**).

Hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA)

La actividad enzimática no mostró interacción significativa entre los factores evaluados, aunque sí evidenció efectos significativos debidos al Manejo individualmente (**Tabla 2**). Se observó una disminución promedio de 11,4% en MB-G y un aumento de 1,02% en MP-G, un aumento del 11,8% VB-G con respecto al VB y de 11% menos en el VP-G con respecto al VP (**Figura 5**).

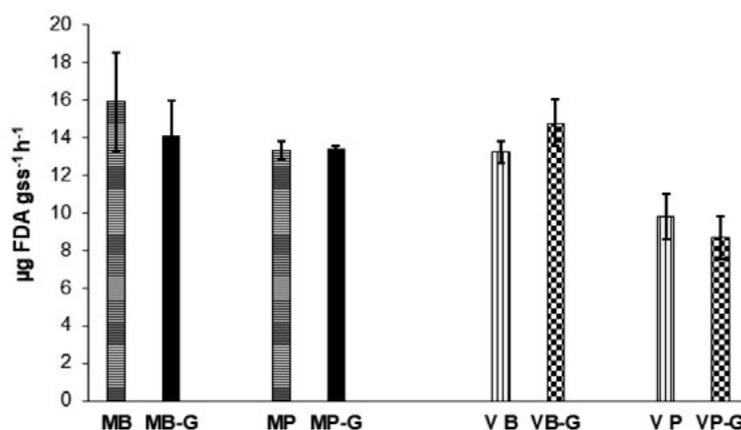


Figura 5. Hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) en Molisol con buena práctica de manejo sin aplicación de glifosato (MB) y con aplicación de glifosato (MB-G), en Molisol con pobre práctica de manejo sin aplicación de glifosato (MP) y con aplicación de glifosato (MP-G), en Vertisol con buena Práctica de manejo sin aplicación de glifosato (MB) y con aplicación de glifosato (MB-G) y en Vertisol con pobre práctica de manejo sin aplicación de glifosato (MP) y con aplicación de glifosato (MP-G).

Figure 5. Fluorescein diacetate hydrolysis (FDA) in Molisol Soil with Good soil Management Practice without application of glyphosate (MB) and with application of glyphosate (MB-G), in Molisol soil with poor soil management practice without application of glyphosate (MP) and with application of glyphosate (MP-G), in Vertisol soil with good soil management practice without application of glyphosate (MB) and with application of glyphosate (MB-G) and in Vertisol Soil with poor soil management practice without application of glyphosate (MP) and with application of glyphosate (MP-G).

DISCUSIÓN

La residualidad de Gli. en las buenas prácticas de manejo fue menor en comparación con las pobres prácticas de manejo (**Figura 1**). Los suelos con buenas prácticas mostraron mayores contenidos de masa microbiana (CBM), posiblemente debido a que presentaron condiciones físico químicas (contenidos de materia orgánica, humedad, macroagregados, etc.) favorables para el desarrollo de los microorganismos que son quienes hacen la principal degradación del herbicida. Esto coincide con Boopathy (2000) quien mencionó que la velocidad de degradación de Gli. se incrementó a mayor presencia de microorganismos, la cual a su vez depende de la cantidad de materia orgánica del suelo, además de otros factores tales como la temperatura, humedad, pH y contenido en oxígeno. Más allá del impacto de una buena práctica de manejo sobre la población total, este manejo actúa favoreciendo la diversidad de la comunidad microbiana del suelo. Al respecto, Lauber *et al.* (2008) también hace referencia a que los cambios en el uso de la tierra pueden tener efectos significativos y duraderos en el contenido de C y nutrientes, la textura del suelo y el pH, y que surgen en gran medida de los cambios en

la composición de especies vegetales asociadas a las prácticas de manejo, y que las abundancias relativas de los diferentes taxones bacterianos variaron entre y dentro de los usos de la tierra aunque ninguno de los taxones fúngicos varió significativamente entre los usos de la tierra.

El impacto inmediato de la aplicación del herbicida mostró en general, efectos inhibitorios sobre la AR inmediatamente después de la aplicación, (**Figura 2a, 2b, 3b**). Lancaster *et al.* (2010) encontró que la mineralización del Gli. siguió una cinética de primer orden como en este trabajo y que la mineralización del C¹⁴-glifosato (hasta CO₂) disminuyó en la medida que se realizaron más aplicaciones en el suelo. Para el caso del Vertisol con buenas prácticas de manejo la AR no disminuyó (**Figura 3a**), y este comportamiento diferente podría vincularse a los contenidos de arcillas y materia orgánica que son factores que tienen efecto sobre la adsorción del Gli. Lerch *et al.* (2008) y Nguyen *et al.* (2018) mencionan que las arcillas, los altos contenidos de óxido de hierro y los contenidos de materia orgánica resultan en una captura física del agroquímico y sus metabolitos, lo cual impide su completa degradación por parte de los microorganismos. Wardle and Parkin-

son (1990) y Hart (1996) encontraron diferentes resultados entre suelos tratados y no tratados con agroquímicos y lo atribuyeron a efectos transitorios, esporádicos e inconsistentes en el tiempo, y en aquellos suelos que sí encontraron diferencias lo atribuyeron al tipo de herbicida y al tipo y uso del suelo.

La masa de microorganismos (CBM) también disminuyó significativamente en todos los tratamientos excepto en VP, lo que demuestra que la aplicación del herbicida provocó la muerte de microorganismos de manera inmediata.

Anderson y Domsch (2010) plantea que cualquier impacto que afecta a los miembros de la comunidad microbiana debería detectarse a nivel de comunidad a través del cambio de una actividad particular. En este sentido, cuando analizamos el cociente metabólico qCO_2 , los mayores valores se encontraron en MP-G y VB-G y se asociaron a menores contenidos de CBM (**Figura 4b y 4c**, respectivamente) lo que muestra que, evidentemente las poblaciones microbianas son diferentes al igual que su respuesta fisiológica a la aplicación de Gli. Dilly (2005) menciona que altos valores del qCO_2 están asociados a los microorganismos que son predominantes en las superficies radicales, que responden rápidamente a cambios ambientales y que son, finalmente, los más resistentes al estrés. En el Molisol con pobre práctica de manejo, el efecto germistático del herbicida sobre AR y CBM se sumó a condiciones físicas y químicas desfavorables para las actividades microbianas: menores contenidos de humedad, materia orgánica y N total (**Tabla 1**). En estos mismos ensayos y tratamientos Novelli *et al.* (2011), encontraron un menor contenido de agregados mayores a 250 μm (macroagregados) (60%) en comparación con el Molisol con buena práctica de manejo (68%) lo cual estaría asociado a una menor circulación de oxígeno, y menor estructuración disponibles para el crecimiento de los microorganismos. En el VB-G, los mayores valores de qCO_2 podrían deberse a la reducción significativa de CBM por efecto del herbicida y a la mayor AR.

Aparicio *et al.* (2013) menciona que el Gli. se transporta preferentemente adsorbido al material particulado y no disuelto en agua, y rescata la im-

portancia de muchas de las propiedades del suelo analizados en su trabajo (materia orgánica, arcilla, pH, cationes, capacidad de intercambio). Sin embargo, los procesos de degradación son complejos y multifactoriales e intervienen, además, condiciones agronómicas, agrometeorológicas y de mineralogía locales.

La FDA es una medida de la actividad enzimática total y es utilizada ampliamente en estudios para evaluar cambios en la actividad microbiana del suelo provocados por el efecto de pesticidas y otros contaminantes (Adam & Duncan, 2001) y está relacionada a la presencia de diferentes enzimas que se activarían frente a ciertos procesos de incorporación de pesticidas al suelo. En este trabajo no encontramos efectos notorios y claros sobre el nivel de FDA cuando se aplicó el Gli. en los distintos suelos y manejos. Coincidentemente, Dennis *et al.* (2018), cuando estudiaron los efectos de aplicaciones únicas de glifosato, glufosinato, paraquat y paraquat-diquat a las dosis recomendadas, sobre la diversidad y función de comunidades de bacterias, archaeas y nematode, encontraron que ninguno de los herbicidas influyó sobre la actividad total de la enzima microbiana FDA o actividad beta-glucosidasa. Cherni *et al.* (2015) cuando estudiaron la respuesta de varios tipos de actividades enzimáticas con aplicación de glifosato (Roundup, 360g L⁻¹) en el suelo a dos concentraciones diferentes equivalentes a 1L ha⁻¹ (dosis recomendada) y 10L ha⁻¹, tampoco detectaron diferencias significativas en la actividad de la fosfatasa, catalasa, proteasas y FDA, excepto por un ligero aumento de la catalasa y fosfatasa con la dosis de 10L ha⁻¹ de glifosato.

CONSIDERACIONES FINALES

Los contenidos residuales de Gli. y AMPA fueron diferentes para cada tipo de suelo y práctica de manejo y mostraron en general un impacto inmediato inhibitorio en las primeras horas sobre las variables microbiológicas evaluadas. Los resultados también mostraron que el impacto inmediato es diferente de acuerdo al tipo de suelo y a las prácticas de manejo al que es sometido. En buenas prácticas la desaparición de Gli. es más rápida que en los suelos con pobres prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, G & H Duncan. 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33 (7): 943-951.
- Alef, K & P Nannipieri. 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Eds. Alef K. and P. Nannipieri. 576 p.
- Anderson, TH & KH Domsch. 2010. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach. *Soil Biology & Biochemistry* 42:2039-2043.
- Aparicio, V; De Gerónimo E; Guijarro Hernandez H; Perez, D; Portocarrero R & C Vidal. (Eds.) 2015. Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente. INTA. 73 p.
- Apricio, VC; E De Gerónimo; D Maino; J Primost, P Carriquirorde & J Costa. 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93:1866-1873.
- Araújo, ASF; RTR Monteiro & RB Abarkeli. 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52, 799-804.
- Barros, YJ; VF Melo; JA Dionísio, EB de Oliveira; L Caron; L Kummer; JCR de Azevedo & LCP Souza. 2010. Indicadores de qualidade de solos em área de mineração e metalurgia de chumbo. I Microrganismos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. doi:10.1590/S0100-06832010000400036.
- Bittencourt Barreto, P; E Forestieri; A Gama-Rodríguez; N De Barros & S Fonseca. 2008. Actividade microbiana, carbono e nitrógeno da biomassa microbiana em plantações de eucalipto, em seqüência de idades. *R. Bras. Ci. Solo* 32: 611-619.
- Boopathy R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*. 74: 63-67.
- Cherni, AE; D Trabelsi; S Chebil; F Barhoumi; ID Rodríguez-Llorente & K Zribi. 2015. Effect of Glyphosate on Enzymatic Activities, Rhizobiaceae and Total Bacterial Communities in an Agricultural Tunisian Soil. *Water Air Soil Pollut.* DOI 10.1007/s11270-014-2263-8
- Colombo, A; G Amodei; S Cantù; F Teoldi; F Cambria; G Rotella; F Natolino; M Lodi; E Benfenati & D Baderna. 2013. Chemical-based risk assessment and in vitro models of human health effects induced by organic pollutants in soils from the Olona Valley. *Science of the Total Environment* 463-464: 790-801.
- Dennis, PG; T Kukulies; C Forstner; TG Orton & AB Pattison. 2018. The effects of glyphosate, glufosinate, paraquat and paraquat-diquat on soil microbial activity and bacterial, archaeal and nematode diversity. DOI:10.1038/s41598-018-20589-6
- Di Renzo, J; F Casanoves; M Balzarini; L Gonzalez; M Tablada & C Robledo. 2018. InfoStat version 2018, Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dilly, O. 2005. Microbial energetics in soils. In: Buscot, F., Varma, A. (Eds.) *Soil Biology, Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Vol. 3. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 123-138.
- Hart, MR & PC Brookes. 1996. Soil microbial biomass and mineralization of soil organic matter after 19 years of cumulative field applications of pesticides. *Soil Biology and Biochemistry* 28: 1641-1649.
- Hensley, DL; Beuerman, DSN & PL CARPENTER. 1978. The inactivation of glyphosate
- Holland, JM. 2004. The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. *Agric. Ecosyst. Environ.* 103: 1-25.
- ISO 10381-6. 1993. Soil quality. Sampling. Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- ISO 14240-2. 1997. Soil quality. Determination of soil microbial. Part 2: Fumigation-extraction method.
- La Cecilia, D. & FO Maggi. 2018. Analysis of glyphosate degradation in a soil microcosm. *Environmental Pollution* 233: 201-207.
- Lancaster, SH; EB Hollister; SA Senseman & TJ Gentry. 2010. Effects of repeated glyphosate applications on soil microbial community composition and the mineralization of glyphosate. *Pest Management Science* 66: 59-64.
- Lauber, CL; Strickland, MS; Bradford, MA & N Fierer. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 2407-2415.
- Lerch, TZ; MF Dignac; N Nnan; G Bardoux; E Barriuso & A Mariotti. 2008. Dynamics of soil microbial populations involved in 2,4-D biodegradation revealed by FAME-based stable Isotope Probing. *Soil Biology and Biochemistry* doi: 10.1016/j.soilbio.2008.09.020
- Mahía, J; A Cabaneiro; T Carballas & M Díaz-Raviña. 2008. Microbial biomass and C mineralization in agricultural soils as affected by atrazine addition. *Biology and Fertility of Soils*. doi:10.1007/s00374-008-0318-.
- Maitre, MI; E Lorenzatti; A Lenardón & S Enrique. 2008. Adsorción-desorción de glifosato en dos suelos argentinos. *Natura Neotropicalis* 39: 19-31.
- Nguyen, NK; U Dörfler; G Welzl; JC Munch; R Schroll & M Suhadolc. 2018. Large variation in glyphosate mineralization in 21 different agricultural soils explained by soil properties. *Science of the Total Environment* 627: 544-552.

- Novelli, LE; OP Caviglia & RJM Melchiori. 2011. Impact of soybean cropping frequency on soil carbon storage in Mollisols and Vertisols. *Geoderma* 167-168: 254–260.
- Okada, E; JL Costa & F Bedmar. 2016. Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage. *Geoderma* 263: 78–85
- Panettieri, M; L Lazaro; R López-Garrido; JM Murillo & E Madejón. 2013. Glyphosate effect on soil biochemical properties under conservation tillage. *Soil Tillage Res.* 133: 16–24.
- Plan Mapa de Suelos, 1998. Carta de Suelos de la República Argentina. Departamento Paraná, Provincia de Entre Ríos, Serie Relevamiento de Recursos Naturales 17, 114 p.
- Quinchiguango Haro, AB. 2012. Tesis de Ingeniera en Recursos Naturales Renovables. Impacto del glifosato sobre flora, fauna, propiedades químicas, físicas, mineralógicas y biológicas del suelo y su residualidad en bosque secundario en Sucumbíos. 2012. Universidad Técnica del norte. Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales.
- Ramirez-Fuente E. & MN Trujillo-Tapia. 2012 *Ciencia y Mar*, XVI (47): 31-36.
- Vance, E; PC Brookes & DS Jenkinson. 1987. *Soil Biol. Biochem.* 19: 703–707.
- Wang, ED. & DW Anderson. 1998. Direct measurement of organic carbon content in soil by the Leco CR-12 carbon analyzer. *Commun. Soil Sci. Plant Anal* 29: 15-21.
- Wardle, DA & D Parkinson. 1990. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant and Soil* 122: 21–28.