

BACTERIAS NATIVAS DEL SUELO CON POTENCIAL PARA LA DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO Y PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL

KEREN HERNÁNDEZ GUIJARRO^{1*}, FERNANDA COVACEVICH¹⁻²⁻³,
VIRGINIA CAROLINA APARICIO¹⁻², EDUARDO DE GERÓNIMO¹⁻²

Recibido: 10/03/2018

Recibido con revisiones: 02/10/2018

Aceptado: 03/10/2018

RESUMEN

El uso de los microorganismos del suelo y sus interacciones benéficas con las plantas y el ecosistema, son una estrategia promisoría para lograr una agricultura sustentable. Debido a la alta frecuencia de detección del glifosato en suelos agrícolas de Argentina y particularmente en la región pampeana, y a su efecto negativo sobre microorganismos benéficos; el presente trabajo tuvo como objetivos aislar y caracterizar bacterias del suelo con capacidad para solubilizar fósforo y para tolerar/degradar el herbicida glifosato y evaluar sus potencialidades promotoras del crecimiento vegetal en plantas de maíz híbrido. Se aislaron un total de 9 cepas bacterianas provenientes de un suelo agrícola y uno prístino de la localidad de Balcarce (Buenos Aires, Argentina) que solubilizaron P en un rango de 249-973 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en medio con fosfato tricálcico. De ellas, tres cepas (denominadas P1, A2 y P12) crecieron en presencia de glifosato y evidenciaron la capacidad de degradarlo al ser cultivadas en medio con el herbicida como única fuente de P. Se destaca que la cepa P12 disminuyó la concentración inicial de glifosato en un 30% en un período de 72 horas. Las cepas fueron identificadas como Enterobacterias por secuenciación parcial del gen ARN ribosomal 16S (géneros *Pantoea* y *Enterobacter*). Un ensayo de inoculación, utilizando separadamente dos suelos de la provincia de Buenos Aires como sustrato: Arroyo Corto y Líbano; evidenció que las cepas A2 y P12 mostraron las mejores respuestas a la inoculación y produjeron un aumento significativo del contenido de materia aérea seca y fresca en las plantas de maíz, respectivamente. Estas cepas resultan promisorias como bioinoculantes y serán necesarios posteriores estudios para potenciar sus funciones en inoculaciones a campo. Este trabajo constituye el primer reporte de Enterobacterias degradadoras de glifosato aisladas de suelos argentinos.

Palabras clave: bioinoculantes, solubilización de P, PGPR, remediación

SOIL NATIVE BACTERIA AS POTENTIAL DEGRADERS OF GLYPHOSATE HERBICIDE AND PLANT GROWTH PROMOTERS

ABSTRACT

The use of microorganisms and their beneficial interaction with plants and the ecosystem, is a promising strategy to achieve a sustainable agriculture. Since glyphosate is present at high frequency at agricultural soils in Argentina, mainly at the Pampean region, and its negative impact on some beneficial soil microorganisms has been reported, the aims of this work were i) to isolate and characterize soil phosphorous-solubilizing bacteria with the capacity to tolerate/degrade glyphosate, and ii) to evaluate their potential as growth-promoter in a trial with maize hybrid plants. A total of 9 bacterial strains were isolated, from both an agricultural and a pristine soil near Balcarce (Buenos Aires, Argentina), solubilizing phosphate in a range of 249 - 973 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of soluble-P on tricalcium phosphate medium. Three of these strains (named P1, A2 and P12), could grow on media containing glyphosate as the sole phosphorus source. P12 strain decreased in 30% the initial glyphosate concentration after 72 hours. The strains were identified as Enterobacteriae by partial 16S rDNA sequencing, belonging to *Pantoea* and *Enterobacter* genera. An inoculation trial, using as substrate two different soils from Buenos Aires province - Arroyo Corto and Líbano- showed that A2 and P12 strains produced significant increases in the dry and fresh matter of maize plants, respectively. These strains are promising as bio-inoculants and further studies will be necessary to enhance their functions in field inoculations. This work constitutes the first report of glyphosate-degrading Enterobacteria isolated from Argentine soils.

Key words: Biofertilizers, P-solubilizing bacteria, PGPR, remediation

1 Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. EEA Balcarce

2 CONICET

3 Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología-Fundación para las Investigaciones Biológicas Aplicadas

* Autor de contacto: hernandez.keren@inta.gov.ar

INTRODUCCIÓN

El consumo de fertilizantes y plaguicidas ha aumentado en las últimas décadas en pos de lograr mayor rendimiento de los cultivos, aplicando modelos productivos intensivos. Sin embargo, el uso continuado de estos productos ha tenido impactos ambientales indeseados como el lavado de nutrientes del suelo, especialmente nitrógeno (N) y fósforo (P), y la contaminación de aguas y sedimentos (Adesemoye & Kloepper, 2009; Tilman *et al.*, 2002).

El P es un elemento esencial para el desarrollo de las plantas ya que interviene en diferentes reacciones, tanto en el desarrollo de la planta en sí, como en el establecimiento de relaciones simbióticas con microorganismos y la protección contra patógenos. Debido a su baja movilidad y disponibilidad en el suelo, resulta un elemento limitante para el desarrollo de los cultivos (García *et al.*, 2014). Sin embargo, cuando el P es aplicado como fertilizante, en ocasiones, entre el 75 y el 90% es precipitado y adsorbido por óxidos de hierro (Fe) y aluminio (Al) del suelo o es lavado causando efectos medioambientales no deseados (Khan *et al.*, 2009).

Algunos microorganismos del suelo son capaces de hacer biodisponible el P inmovilizado a través de la producción de ácidos orgánicos y la excreción de fosfatasa ácida (Khan *et al.*, 2014). La aplicación de bioinoculantes solubilizadores de fósforo potencia este proceso que naturalmente está disminuido por la alta capacidad buffer del suelo. Dentro de los principales grupos bacterianos utilizados como inoculantes con estas funciones se encuentran cepas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*, las que al hacer biodisponible el fósforo para las plantas, contribuyen a aumentar el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Anzuay *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014). Además, representantes de estos grupos bacterianos promueven el crecimiento vegetal a través de diversos mecanismos, como por ejemplo, la producción de ácido indol-acético, la fijación de N₂, el antagonismo contra microorganismos patógenos, la producción de sideróforos o antibióticos, entre otros (Zaidi *et al.*, 2009).

La biofertilización aplicada para aumentar la biodisponibilidad de P por los cultivos es una estrategia promisoría. El uso de microorganismos nativos adaptados a las condiciones en las que realizarán sus funciones constituye una estrategia que podría potenciar la eficacia del proceso (Pérez-Montaña *et al.*, 2014). Bacterias solubilizadoras de P nativas, pertenecientes a los géneros *Pantoea*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*, han sido aisladas de suelos de la Puna argentina con características promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés de "Plant Growth-Promoting Rhizobacteria"), como la producción de sideróforos e indol (Viruel *et al.*, 2011). Sin embargo, la evaluación de sus funciones en ensayos con plantas o de campo no ha sido reportada.

Es conocido que una vez que los inoculantes microbianos son añadidos al suelo, encuentran competencia por parte de la microbiota indígena, lo que dificulta su establecimiento y la eficiencia de sus funciones. Al respecto, existen otros factores que pueden modificar este proceso como son su interacción con el cultivo, el tipo de suelo, el mecanismo por el cual se produjo el inoculante y las prácticas de manejo agrícolas adoptadas (Creus, 2017).

Una de las prácticas agrícolas más extendidas en la región es la adopción del paquete tecnológico siembra directa-cultivos transgénicos resistentes al glifosato (GP). Esto conlleva al uso del herbicida de manera intensiva y extensiva como parte de este manejo pero también es aplicado en cultivos forestales, cítricos y olivares, y en los períodos de barbecho.

Son varios los estudios que demuestran los efectos negativos del uso del GP sobre importantes grupos microbianos del suelo como: Actinobacterias, bacterias fijadoras de N, hongos formadores de micorrizas, entre otros (Angelini *et al.*, 2013; Druille *et al.*, 2013; Zaller *et al.*, 2014; Newman *et al.*, 2016).

Por otra parte, la principal vía de degradación del GP es microbiológica y han sido aisladas bacterias del suelo capaces de degradarlo, como *Pseudomonas* sp, *Arthrobacter radiobacter*, *Flavobacterium* sp, *Ochrobactrum anthropi* y *En-*

terobacter cloacae (Balthazor & Hallas, 1986; Pipke & Amrhein, 1988; Moneke *et al.*, 2010; Benslama & Boulahrouf, 2013; Kryuchkova *et al.*, 2014). En este sentido, se han descrito dos rutas metabólicas a través de las cuales ocurre su biodegradación, rindiendo como metabolitos primarios la sarcosina y el ácido amino metilfosfónico (AMPA) (Rueppel *et al.*, 1977).

Si bien el GP es considerado moderadamente persistente (entre 30-170 días de vida media), en ocasiones se sugiere que las tasas de aplicación son mayores que las tasas de disipación, favoreciendo su persistencia en el ecosistema (Primost *et al.*, 2017). En la región pampeana, en los últimos años han aumentado los reportes sobre altas frecuencias de detección, tanto de GP como de su metabolito AMPA, en diferentes matrices ambientales (Aparicio *et al.*, 2013; De Gerónimo *et al.*, 2014).

En Argentina, el conocimiento sobre los microorganismos nativos que contribuyen a la degradación del herbicida en diferentes ambientes es escaso. Al respecto, existen reportes de una cepa de *Bradyrhizobium sp.* tolerante al herbicida y cepas degradadoras de *Pseudomonas sp.*, aisladas de suelos con sistemas de labranzas orgánico y convencional (Zabaloy & Gómez, 2005; Rörig, 2012). Resultaría estratégico detectar y aislar cepas nativas degradadoras de GP y que además evidencien potencialidades para la promoción de crecimiento vegetal.

El uso de bioinoculantes es una alternativa prometedora para la solución integral de problemas medioambientales generados por la producción agrícola, porque es conocido que los microorganismos poseen características que ayudan a la toma de nutrientes por la planta, promueven

el crecimiento vegetal, contribuyendo a disminuir la fertilización química, y degradan agroquímicos, disminuyendo su carga ambiental. Basados en esto, los objetivos de este trabajo han sido, por una parte, aislar y caracterizar microorganismos nativos solubilizadores de P con tolerancia al herbicida glifosato y capacidad para degradarlo; y por otra, evaluar sus potencialidades como promotores del crecimiento vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de suelo

Se realizó el aislamiento de bacterias solubilizadoras de P a partir de muestras de suelo colectadas en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce (Buenos Aires, Argentina). Estas consistieron en 50 sub-muestras colectadas a una profundidad de 0-5 cm, por sitio, las que posteriormente fueron homogeneizadas, tamizadas (2 mm) y cuarteadas para su análisis. Los suelos correspondieron a un área prístina (P) y área agrícola (A) con más de 5 años de aplicación del herbicida glifosato, a razón de 4,6 mg de ingrediente activo (ia.) por kg⁻¹ de suelo por año, con rotaciones trigo/soja. Ambos suelos son Arguidoles típicos de la serie Balcarce y sus características físico-químicas: contenido de materia orgánica (Nelson & Sommers, 1982), capacidad de intercambio catiónico (Chapman, 1965), P Bray (Bray & Kurtz, 1945), pH (1:2,5 suelo:agua) y textura (Gee & Bauder, 1986), son indicadas en la **Tabla 1**.

Aislamiento de cepas solubilizadoras de P

El aislamiento de cepas edáficas nativas solubilizadoras de P se realizó mediante diluciones seriadas de suelo, sembradas en medio agar NBRIP

Tabla 1. Características físico-químicas de los suelos a partir de los cuales se aislaron las bacterias descritas en el trabajo.

Table 1. Physico-chemical properties of soils used for isolating the bacteria characterized in this study.

Suelo	MO (%)	P-Bray (mg kg ⁻¹)	pH (suelo:agua 1:2,5)	Textura
Agrícola	6,0	68,2	6,5	35,3 % arena; 32,5 % limo; 32,2 % arcilla
Prístino	10,3 %	46,5	6,3	43,8 % arena; 26,9 % limo; 29,3 % arcilla

MO: Materia orgánica (%)

MO: Organic matter (%)

(National Botanical Research Institute Phosphate Growth Medium), conteniendo fosfato tricálcico (PTC) como única fuente de fósforo (Nautiyal *et al.*, 2000). Los cultivos fueron incubados a 28 °C durante 72 h y se seleccionaron y purificaron los microorganismos promisorios en base al tamaño del halo claro formado alrededor de la colonia.

La capacidad de solubilizar P fue evaluada mediante cuantificación del fósforo soluble formado después de 5 días de incubación en 50 mL de caldo NBRIP, descrito anteriormente, mantenido a 28 °C, en agitación a 150 rpm. Se empleó el método colorimétrico del ácido ascórbico para la determinación de fósforo soluble según Watanabe & Olsen (1965). Se determinó el pH del medio y se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) mediante el método de recuento de viables en placas. Para la selección de cepas se utilizó el criterio diámetro de solubilización = diámetro total – diámetro de la colonia.

Identificación de las cepas solubilizadoras de P

La identificación de los aislamientos seleccionados por su capacidad solubilizadora de P se realizó mediante la amplificación y secuenciación de la región génica variable V4 del ARN ribosomal 16S. Para ello se realizó la extracción de ADN a partir de nueve cultivos puros utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, USA). Se usaron los cebadores Com1 (forward) 5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3', y Com2 (reverse) 5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3' para amplificar un fragmento del gen del ARN 16S ribosomal comprendido entre las posiciones 519-926 de *Escherichia coli*. La reacción de PCR incluyó Buffer 1X, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 μM de cada cebador, 1 μL de templado ADN y 2U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, USA) en un volumen final de 30 μL. El termociclado consistió de 5 min de desnaturalización a 95°C seguidos por 32 ciclos de 95 °C por 20 seg, 54 °C durante 15 seg y 72 °C durante 30 seg, terminando con una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR obtenidos fueron de 407 pb, los que una vez purificados con PEG 6000, se secuenciaron (ambas hebras) en un secuenciador MegaBace 750 (GE, Suecia). La búsqueda de similitud de secuencias se realizó mediante la herramienta BLAST del

GenBank y el clasificador del Proyecto de base de datos ribosomales (RDP) (Cole *et al.*, 2005). El alineamiento se realizó mediante ClustalW2. Para el análisis filogenético y la construcción del árbol se usó MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) mediante análisis de máxima verosimilitud, método Kimura 2 parámetros, prueba de filogenia "bootstraps", 1000 réplicas. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos de GenBank.

Determinación de capacidad de crecimiento en presencia de glifosato y degradación del herbicida

Los aislamientos con capacidad de solubilizar P fueron evaluados para determinar su tolerancia al herbicida glifosato. Nueve cepas fueron inoculadas en 100 mL de medio de sales minerales (MSM) (Fan *et al.*, 2012), conteniendo 0,2 % de glucosa como fuente de C y 0,5 mM de GP (Pestanal®, Sigma) como única fuente de P. Las concentraciones de inóculo fueron de 1. 10⁴ UFC mL⁻¹. Los cultivos fueron incubados a 28° C durante 72 h en agitación a 150 rpm. Como controles se incluyeron medios de cultivos que contenían como única fuente de fósforo K₂HPO₄ (0,5 mM) y MSM más GP sin inocular. Cada cultivo y control se realizó por triplicado. Transcurrido este tiempo se determinaron las UFC mediante el método de recuento de microorganismos viables en placas. Las cepas que evidenciaron crecimiento en este medio, fueron cultivadas nuevamente en las condiciones descritas anteriormente y se tomaron muestras de los cultivos a las 24, 48 y 72 h para determinar las concentraciones de GP residual y de AMPA mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (UHPLC MS/MS), según la metodología propuesta por Primost *et al.* (2017). Para ello, previamente se realizó la extracción de GP y AMPA con buffer fosfato/borato y la derivatización pre-columna con 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC).

Las variaciones significativas de las concentraciones de GP y de AMPA para cada cepa, fueron detectadas mediante análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas en el tiempo usando el paquete estadístico SAS (2009).

Evaluación de la capacidad promotora de crecimiento de las cepas seleccionadas

Las cepas solubilizadoras de P que evidenciaron la capacidad degradadora de GP fueron seleccionadas para evaluar su potencial PGPR en condiciones controladas. Se determinó la respuesta a la inoculación de plantas de maíz híbrido DEKALB® (Agropoints) crecidas en dos suelos agrícolas de la provincia de Buenos Aires de las localidades de Arroyo Corto (AC) y Líbano (L) (**Tabla 2**).

Para ello se estableció un ensayo en macetas (300 mL) utilizando muestras homogenizadas de ambos suelos por separado (0-20 cm), mezclados con perlita y arena estériles en proporción suelo:perlita:arena 2:1:1 vol.

La inoculación se realizó a la siembra y se usaron semillas de maíz pre-germinadas. Los inóculos bacterianos fueron preparados a partir de cultivos individuales de tres cepas (denominadas P1, A2 y P12) que fueron crecidas en caldo de Luria Bertani (LB), durante 18 h a 28°C. Las bacterias fueron colectadas y lavadas mediante centrifugación a 10500 g y resuspendidas en solución salina 0,85% a una concentración de $1 \cdot 10^8$ UFC mL⁻¹.

El ensayo constó de cuatro tratamientos: no inoculado (NI) e inoculados con cada una de las cepas P1, A2 y P12, con cuatro repeticiones para cada tipo de sustrato (AC y L), lo que resultó en 32 unidades experimentales.

Las plantas fueron mantenidas en cámara de crecimiento (12/12 h luz/oscuridad, 24 °C) y regadas periódicamente a efectos de mantener el sustrato a capacidad de campo del 60%. A los 20 días después de la inoculación, cuando las plantas se encontraban en fase de 4 hojas, se separó la parte aérea de la radical. En la parte aérea se determinó el área foliar (Licor Area Meter) y el peso fresco y seco. El

material radical fue lavado para la eliminación de las partículas de sustrato adheridas a las raíces y se determinó el peso radical fresco y seco.

Se realizaron análisis de varianza para cada una de las variables por tratamiento, separadamente para cada suelo, mediante ANOVA, usando SAS (2009). Las diferencias entre las medias para cada tratamiento fueron comparadas mediante la prueba de Tukey ($p > 0,05$).

Para aquellos parámetros (PA) donde se detectó efecto significativo de la inoculación de los tratamientos, se calculó la respuesta a la inoculación (RI) de acuerdo a la siguiente relación:

$$RI(PA_i) = \frac{(PA_i(I) - \text{media } PA_i(\text{Control}))}{\text{media } PA_i(\text{Control})} \times 100$$

Donde:

- PA_i (I) corresponde al parámetro individual de las plantas inoculadas con cada una de las cepas,
- media PA_i (Control) corresponde al valor promedio del parámetro individual de las plantas control (no inoculadas).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fósforo

Se obtuvieron nueve aislamientos que fueron seleccionados según el criterio de formación de halos mayores a 0,5 cm de diámetro de solubilización en el medio NBRIP. El número de cepas solubilizadoras de P no estuvo relacionado con el tipo de uso del suelo, habiéndose obtenido cinco aislamientos del suelo pristino y cuatro del agrícola (**Tabla 3**).

Los aislamientos fueron identificados basados en una secuencia parcial del gen ARN ribosomal 16S (Lane *et al.*, 1985). La mayoría mostró alta similitud de secuencias con especies pertenecientes a

Tabla 2. Características químicas de los suelos utilizados para el ensayo de inoculación en condiciones controladas.

Table 2. Chemical properties of soils used for bacteria inoculation under controlled conditions.

Suelo	C.I.C. (cmol kg ⁻¹)	Zn	Fe (mg kg ds ⁻¹)	B	P-Bray (mg kg ⁻¹)	MO (%)	pH
Arroyo Corto	21,4	1,0	50,8	0,9	29,9	4,0	6,5
Líbano	23,4	0,7	43,4	0,8	12,9	3,1	6,7

C.I.C. (cmol kg⁻¹) = C.E.C. (cmol kg⁻¹) Cation Exchange Capacity.

Tabla 3. Comparación de los aislamientos en cuanto a su capacidad solubilizadora de fósforo (P): cuantificación del P soluble, pH y densidad de células en medio de cultivo con PTC, y en cuanto a su crecimiento en presencia del herbicida glifosato (GP) como única fuente de P.

Table 3. Comparison of soil bacterial strains based both on their capacity of P-solubilizing (determinations of soluble-P concentrations, pH, bacterial growth in medium with PTC) and their growth capacity in herbicide glyphosate (GP) medium as sole P source.

Cepas	Función solubilizadora de P en medio con PTC			Crecimiento en medio con GP	Número de Acceso (NCBI)
	P soluble ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	pH	Crecimiento bacteriano ($\log \text{UFC mL}^{-1}$)		
P1	249,0 e	4,15 bc	6,84 d	+	KM203845
A2	507,3 bc	4,31 abc	7,43 abc	+	KM203844
P3	250,1 e	4,13 bc	7,10 bcd	-	MG808279
A4	400,4 de	4,11 c	6,10 e	-	MG808277
P6	973,1 a	4,17 bc	7,53 ab	-	MG808278
A7	443,8 cd	4,48 a	7,05 cd	-	MG808276
P12	510,0 bc	4,34 ab	7,61 a	+	KM203843
A13	620,8 b	4,31 abc	7,63 a	-	MG808280
P14	335,3 de	4,32 abc	7,32 abc	-	MG808281
Control*	90,0	6,7	-		

UFC: Unidades Formadoras de Colonias; (+) aumentaron en 2 órdenes de magnitud el número de UFC mL^{-1} en 72 h de cultivo; (-) disminuyeron el número de UFC mL^{-1} en 72 h de cultivo.

* sin inóculo

Para cada parámetro, filas con letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas ($p < 0,05$). Denominación de cepas: A indica origen de suelo agrícola; P indica prístino.

UFC=CFU: Colony Forming-Unit; (+) increase in 2 orders the CFU mL^{-1} after 72 h in the presence of GP; (-) decrease the CFU mL^{-1} after 72 h in the presence of GP. In the same column, rows with different low case letters indicate significant differences among bacterial strains ($p < 0,05$). Strain denominations: Letter A indicates strains isolate from agricultural soil and letter P indicates strains isolate from pristine soil.

la familia *Enterobacteriaceae*, disponibles en las bases de datos consultadas. La secuenciación parcial del gen ARN ribosomal 16S mediante el uso de cebadores conservados, que amplifican la región variable V4 analizada en este estudio, se ha usado ampliamente en la caracterización de comunidades bacterianas del suelo (Guo *et al.*, 2015; Gravuer & Eskelinen, 2017; Li *et al.*, 2019). Sin embargo, la secuenciación completa del gen sería recomendable para eliminar el sesgo introducido por los cebadores y confirmar la identificación taxonómica reportada para estas cepas. Todos los aislamientos del suelo prístino, conjuntamente con tres aislamientos del suelo agrícola, presentaron elevada similitud con secuencias de bacterias de los géneros *Pantoea* y *Enterobacter* (**Figura 1**). Una cepa proveniente del sitio agrícola mostró similitud de secuencia con especies del género *Streptomyces*, el cual es uno de los más representativos de las Actinobacterias.

Diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae* han sido descriptos como solubilizadores de P capaces de promover el crecimiento y desarrollo vegetal. En tal sentido, Viruel *et al.* (2011) reportaron cepas nativas de la Puna Argentina, de los géneros *Pantoea*, *Enterobacter* y *Serratia*, solubilizadoras de P y productoras de sideróforos e indol en condiciones de laboratorio. Walpola *et al.* (2013) informaron que dos cepas de *Pantoea* (*P. agglomerans* y *P. rodasii*) poseían un alto potencial para ser usadas como bioinoculantes, debido a su capacidad de solubilizar P en diferentes condiciones y promover el crecimiento vegetal en experimentos en invernáculo. Gupta *et al.* (2012) reportaron cepas de *Enterobacter hormaechei* y *Serratia marcescens* solubilizadoras de P capaces de estimular el crecimiento y la biosíntesis de aloin-A en plantas de *Alloe*.

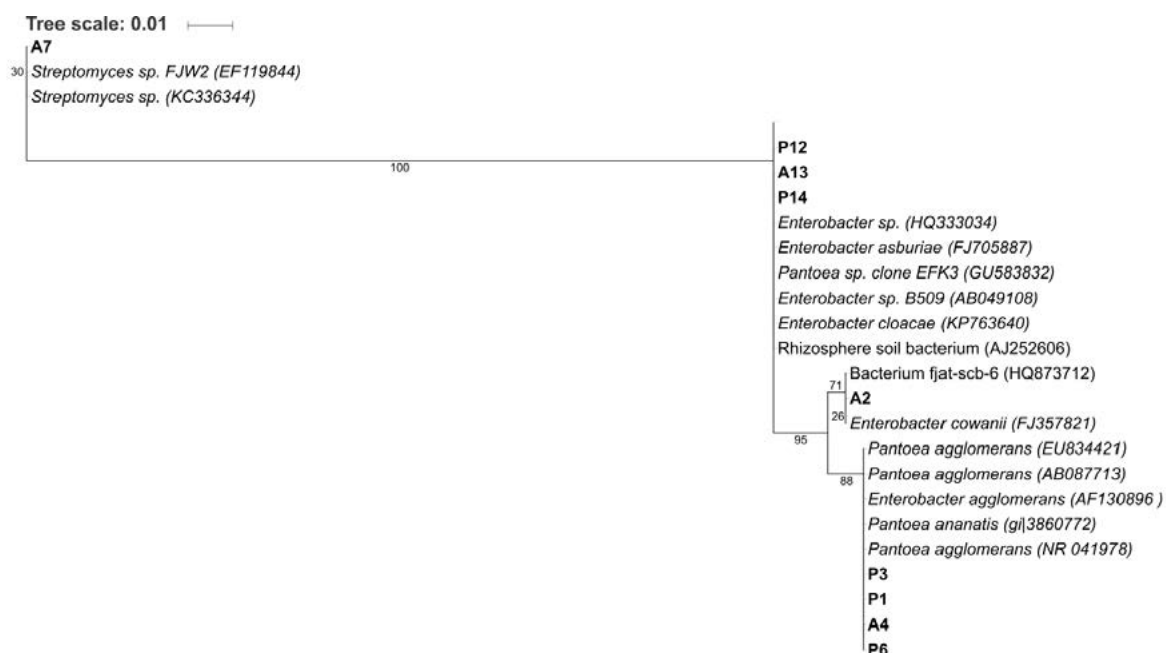


Figura 1. Árbol filogenético construido mediante análisis de máxima verosimilitud que muestra la relación entre las secuencias de un fragmento del gen ARNr 16S de las cepas en estudio y las secuencias homólogas depositadas en la base de datos NCBI. Los números en los nodos indican el porcentaje de réplicas en las cuales se asociaron las secuencias de la misma manera en el árbol (Prueba Bootstraps, 1000 réplicas).

Figure 1. Phylogenetic tree constructed by maximum likelihood, showing the relationships among 16S rRNA ribosomal gene from studied strains and related taxa deposited at NCBI database. Numbers at the nodes indicate the percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates).

Caracterización de las propiedades solubilizadoras de P y degradación de GP

El 66% de las cepas mostraron concentraciones de P soluble en el medio de crecimiento de más de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabla 3). La cepa P6 fue la que evidenció la mayor capacidad solubilizadora, con valores cercanos a 1 mg mL^{-1} , seguidas por las cepas A13, P12 y A2 que mostraron concentraciones de P soluble en el medio en un rango de $507\text{-}620 \mu\text{g mL}^{-1}$. Las cepas P1, P3, A4 y P14 evidenciaron la menor capacidad de solubilización, detectándose concentraciones de P cercanas a los $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ en el medio de cultivo. Los rangos de solubilización se mantuvieron dentro de los reportados en otros estudios, aunque en general fueron superiores. En este sentido, Anzuay *et al.* (2013) cuantificaron la habilidad solubilizadora de P de bacterias asociadas a cultivos de maní nativas de suelos de Córdoba (Argentina) y mostraron que de 19 cepas analizadas, 4 evidenciaron una capacidad de liberación de P soluble superior a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$. Las cepas restantes mos-

traron rangos de liberación de P en el medio de $12,9$ a $380 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por su parte, Gupta *et al.* (2012) reportaron rangos de solubilización de P en el medio entre $25\text{-}340 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cuatro cepas nativas de India asociadas a raíces de *Aloe barbadensis*. En nuestro estudio, sin embargo, las cepas seleccionadas evidenciaron mayor habilidad solubilizadora de P a partir de PTC, con valores superiores a $249 \mu\text{g mL}^{-1}$, siendo ésta la menor concentración de P en el medio detectada para la cepa P1. Para todas las cepas se observó un descenso marcado del pH respecto al medio de cultivo control sin inocular, sin embargo, este descenso no estuvo relacionado con la cantidad de P detectado en solución (Coef. $0,235$; $p\text{-valor} = 0,347$). Resultados similares fueron reportados por Anzuay *et al.* (2013), quienes detectaron los menores valores de pH tanto en medios donde crecieron cepas con alta y con baja capacidad de solubilización. En otros estudios, sin embargo, la cuantificación de P soluble y el pH han estado correlacionados negativamente indicando la producción de ácidos orgánicos (Chen *et al.*, 2006;

Viruel *et al.*, 2011; Walpola *et al.*, 2013). Estos autores también han reportado una correlación positiva entre el grado de solubilización y la densidad celular detectada en el medio, lo que coincide con nuestros resultados. En nuestro estudio, la mayor capacidad solubilizadora de P estuvo fuertemente asociada con un mayor crecimiento de las bacterias después de 5 días de cultivo en medio con PTC (Coef. 0,578; p-valor=0,012).

De las nueve cepas evaluadas, sólo las cepas P1, A2 y P12 evidenciaron la capacidad de crecer en el medio con GP como única fuente de P (Tabla 3), mostrando un incremento en la concentración celular respecto al cultivo inicial, del orden de 10^7 UFC mL⁻¹ a las 72 h (P1: $2,7 \cdot 10^7$, A2: $6,8 \cdot 10^7$; P12: $5,5 \cdot 10^7$ UFC mL⁻¹). En el medio de cultivo con P inorgánico, el crecimiento fue mayor, alcanzando el orden de 10^9 UFC mL⁻¹ (P1: $2,5 \cdot 10^9$; A2: $5,1 \cdot 10^9$; P12: $1,5 \cdot 10^9$ UFC mL⁻¹). Si bien la presencia de GP en el medio como única fuente de P, limitó el crecimiento bacteriano, las concentraciones celulares mostraron diferencias con las del cultivo al tiempo 0, lo que no ocurrió para el resto de las cepas. Teniendo en cuenta que la mayor capacidad solubilizadora de P fue detectada en cultivos con concentraciones del orden de 10^7 UFC mL⁻¹, hecho que fue coincidente con otros reportes (Anzuay *et al.*, 2013), la presencia de GP para estas 3 cepas no estaría afectando el número de bacterias que garantizaría una eficiente solubilización de P. Sin embargo, la relación entre los procesos de solubilización de P y degradación del GP deberán ser evaluados en condiciones de campo teniendo en cuenta que la utilización del herbicida como fuente de P por las bacterias del suelo es inducido cuando el P inorgánico es limitante (Ternan *et al.*, 1998), aspecto que en ambientes naturales no ocurre frecuentemente (Sviridov *et al.*, 2015). También el GP compite con el P inorgánico por los sitios de unión a las partículas del suelo, fundamentalmente óxidos de Fe y Al y arcillas (Wang *et al.*, 2005), modificando su biodisponibilidad.

Existieron diferencias significativas entre las concentraciones de GP y AMPA a través del tiempo para las 3 cepas ($p=0,0104$ y $p>0,0001$ para GP y AMPA respectivamente). En este sentido, la cepa P12 evidenció un 30% de disminución de la

concentración inicial de GP a las 72 h, seguida por la cepa P1 (Figura 2). Consecuentemente, y confirmando la degradación microbiana del GP, se observó un aumento significativo en las concentraciones de AMPA en los medios de cultivo en los cuales crecieron las cepas seleccionadas, que abarcaron un rango de $203-253 \mu\text{g L}^{-1}$ a las 72 h (Figura 3).

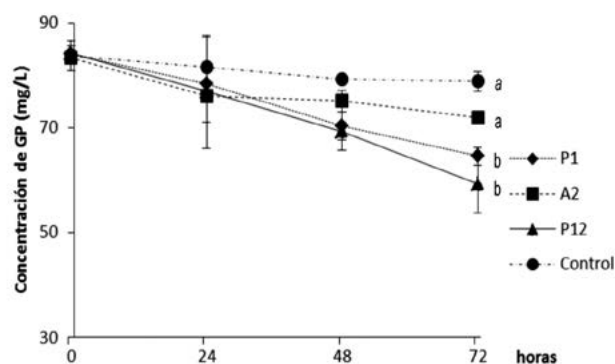


Figura 2. Evolución de la concentración de glifosato (GP) en el medio de cultivo inoculado con las diferentes cepas estudiadas (P1, A2 y P12). Barras verticales indican el desvío estándar ($n=3$). Letras iguales indican diferencias estadísticas no significativas en la concentración de GP a las 72 h de incubación ($p<0,05$; prueba de Tukey).

Figure 2. Glyphosate (GP) concentration evolution in culture media for the studied strains (P1, A2 and P12). Vertical bars indicate standard deviations ($n=3$). Same letters indicate no statistical differences of GP concentrations at 72 h ($p<0,05$; Tukey test).

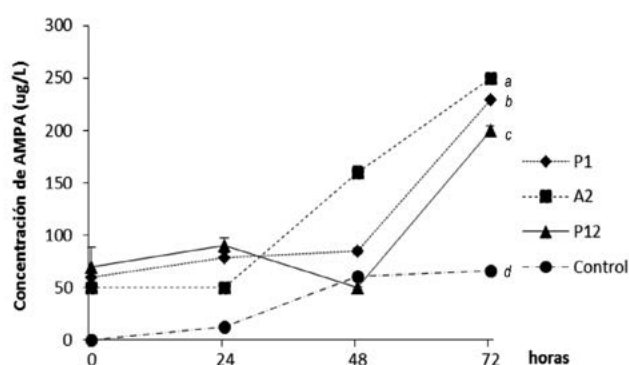


Figura 3. Evolución de la concentración de AMPA en el medio de cultivo inoculado con las diferentes cepas estudiadas (P1, A2 y P12). Barras verticales indican el desvío estándar ($n=3$). Letras iguales indican diferencias estadísticas no significativas en la concentración de AMPA a las 72 h de incubación ($p<0,05$; prueba de Tukey).

Figure 3. Evolution of AMPA concentrations in culture media for the studied strains (P1, A2 and P12). Vertical bars indicate standard deviations ($n=3$). Same letters indicate no statistical differences of AMPA concentrations at 72 h ($p<0,05$; Tukey test).

De las tres cepas degradadoras, P12 fue la que más GP degradó, seguida por P1, detectándose menos formación de AMPA como metabolito de este proceso. Ambas cepas provinieron de un suelo prístino, lo que está en concordancia con que la mayoría de los microorganismos son capaces de convertir GP en AMPA, aun cuando no hubieran estado expuestos al herbicida con anterioridad (Sviridov *et al.*, 2015; Hernández Guijarro *et al.*, 2018). El AMPA presenta mayor persistencia en el suelo que su molécula parental (Bento *et al.*, 2016), por lo que la ruta del metabolismo por la vía de la sarcosina es preferible. En nuestro estudio, sólo se determinó la concentración de AMPA, pero inferimos que la vía alternativa ocurrió, teniendo en cuenta que no todo el GP degradado se convirtió en AMPA. Esta presunción tiene como base que la relación estequiométrica de cada molécula de GP convertida en AMPA es 1:1 (Pizzul *et al.*, 2009), lo que no se evidenció en este experimento, teniendo en cuenta que las concentraciones iniciales de GP en el medio fueron de aproximadamente 85 mgL⁻¹.

En las condiciones actuales de producción agrícola, con frecuencias altas de aplicación del herbicida, las Enterobacterias resultarían bioinoculantes promisorios por sus antecedentes como solubilizadores de P y promotores del crecimiento vegetal (Khan *et al.*, 2014); así como por su capacidad para tolerar y degradar el GP (Sviridov *et al.*, 2015). Un estudio donde ambas cualidades se manifiesten en un mismo microorganismo, aislado a partir de suelos argentinos, no había sido reportado con anterioridad. Se destaca además que ambas capacidades fueron detectadas en microorganismos nativos de Argentina que, además han sido caracterizados en este estudio a través de metodologías moleculares.

En la literatura internacional se reportó la rizobacteria *Enterobacter cloacae* K7 que fue capaz de disminuir en un 50 % las concentraciones iniciales de GP en cinco días, produciendo los compuestos no tóxicos sarcosina y glicina (Kryuchkova *et al.*, 2014). Esta cepa además fue promotora del crecimiento vegetal por su capacidad de fijar N, producir fitohormonas y solubilizar P.

En Argentina, se ha reportado una cepa del género *Bradyrhizobium* capaz de crecer en pre-

sencia de GP como única fuente de carbono y energía (Zabaloy & Gómez, 2005). También se aislaron microorganismos tolerantes al herbicida pertenecientes a los géneros *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Labrys* y *Pseudomonas*, provenientes de suelos bajo manejo orgánico y labranza convencional (Rörig, 2012). Sin embargo, no existen reportes previos de Enterobacterias nativas degradadoras del herbicida, por lo que este trabajo estaría aportando en este sentido, al igual que su capacidad para solubilizar P.

Capacidad promotora de crecimiento de las cepas seleccionadas

Se detectó variación en la respuesta de las plantas de maíz a la inoculación de las cepas P1, A2 y P12 en los 2 suelos probados (AC y L) (Tabla 4). La cepa que mejor respuesta produjo en el suelo AC fue P12, incrementando significativamente el área foliar y el peso aéreo fresco. La cepa A2 aumentó el peso aéreo seco de las plantas. En el suelo L, la cepa A2 tuvo el mejor comportamiento en relación al incremento del peso aéreo seco. Las inoculaciones con la cepa P1 no evidenciaron diferencias significativas de crecimiento de las plantas respecto al control en ninguno de los dos suelos, por lo que de las tres cepas analizadas, ésta resultaría la menos eficiente para las condiciones probadas.

En la literatura internacional se reporta que la inoculación de *E. cloacae*, cepa aislada de la rizósfera del maíz, promovió el crecimiento vegetal de estas plantas en condiciones de laboratorio y aumentó la biomasa de la mazorca en condiciones de campo (Morales-García *et al.*, 2011). Sin embargo, los mecanismos por los cuales se produjeron estos efectos no fueron evaluados.

En nuestro estudio, las cepas nativas P12 y A2, identificadas como Enterobacterias, además de ser degradadoras de GP y solubilizadoras de P, presentaron características PGPR. Las plantas que crecieron en el suelo AC evidenciaron mayores respuestas positivas a la inoculación que aquellas crecidas en el suelo L (Tabla 4). Es probable que las características del suelo (el mayor contenido de P disponible y de materia orgánica hallado en el suelo AC, Tabla 2), las poblaciones

Tabla 4. Respuesta de plantas de maíz a la inoculación con bacterias solubilizadoras de P y degradadoras de glifosato.**Table 4.** Response of maize plants to inoculation with soil bacteria P-solubilizers and glyphosate degraders.

Suelo	Cepas	Peso Aéreo Fresco (g)	Peso Fresco Raíz (g)	Peso Aéreo Seco (g)	Peso Seco Raíz (g)	Área Foliar (cm ²)	RI-Peso Aéreo Fresco (%)	RI-Peso Aéreo Seco(%)	RI-Área Foliar (%)
Arroyo Corto (AC)	P1	1,62 (± 0,45) b	0,57 (± 0,18)	0,31 (± 0,12) b	0,08 (± 0,02)	33,9 (± 11,1) b	-5	17	-6
	A2	2,43 (± 0,34) ab	0,69 (± 0,18)	0,57 (± 0,09) a	0,06 (± 0,02)	50,3 (± 3,5) ab	43	114	40
	P12	2,60 (± 0,35) a	0,74 (± 0,13)	0,40 (± 0,05) ab	0,08 (± 0,01)	64,3 (± 13,2) a	53	51	79
	Control	1,70 (± 0,18) b	0,58 (± 0,09)	0,27 (± 0,05) b	0,05 (± 0,01)	35,9 (± 5,9) b	--	--	--
Libano (L)	P1	2,52 (± 0,15)	0,64 (± 0,17)	0,51 (± 0,29) ab	0,07 (< 0,01)	60,9 (± 32,5)	--	58	--
	A2	3,58 (± 0,37)	0,80 (± 0,06)	0,84 (± 0,19) a	0,07 (± 0,02)	85,1 (± 0,4)	--	158	--
	P12	2,35 (± 0,33)	0,71 (± 0,11)	0,49 (± 0,03) ab	0,06 (± 0,01)	53,8 (± 0,5)	--	51	--
	Control	2,38 (± 0,49)	0,71 (± 0,20)	0,33 (± 0,06) b	0,07 (± 0,03)	49,6 (± 8,2)	--	--	--

Parámetros resaltados en negrita evidenciaron diferencias significativas por la inoculación ($p < 0,05$). Valores entre paréntesis corresponden a desvíos estándar

RI: respuesta a la inoculación

Parameters highlighted in bold showed significant differences by inoculation ($p < 0,05$). Values in parentheses correspond to standard deviations

RI: Response to bacterial inoculation

microbianas edáficas y la interacción con la planta a través de los exudados radicales, además de otras probables propiedades PGPR no evaluadas en este trabajo, hayan provocado esta respuesta diferencial a la inoculación. Para comprender los mecanismos involucrados en este complejo proceso serán necesarios posteriores estudios.

CONCLUSIONES

En nuestro estudio, además de evaluar la potencialidad de las cepas de solubilizar P, se probó la tolerancia al glifosato y la posibilidad de degradarlo, teniendo en cuenta que este herbicida es usado comúnmente en los sistemas productivos actuales y su persistencia es alta en algunos suelos.

Tres cepas solubilizadoras de P provenientes tanto del sitio prístino y del agrícola, fueron capaces de crecer en presencia de glifosato y degradarlo, mientras que el resto de las cepas solubilizadoras de P evidenciaron inhibición de su crecimiento en presencia del herbicida en el medio. Las cepas que evidenciaron ambas funciones *in vitro* fueron nativas de suelos con y sin historial de aplicación de glifosato y presentaron alta similitud de secuencia del gen ARN ribosomal 16S con los géneros *Pantoea* y *Enterobacter*.

Dos de las tres cepas seleccionadas promovieron el crecimiento de plantas de maíz en suelos agrícolas, diferentes a los suelos de las que fueron aisladas. Futuros estudios deberían conducirse para evaluar su eficiencia en inoculaciones a campo, en cuanto a la promoción de crecimiento vegetal y la degradación del herbicida glifosato en suelos contaminados, así como de los posibles mecanismos de establecimiento en el suelo e interacciones con el resto de la comunidad microbiana edáfica.

Debido al uso generalizado del glifosato para la producción agrícola, la tolerancia al herbicida debería ser considerado para la selección de bioinoculantes dado que el herbicida podría limitar el desarrollo y establecimiento de las cepas luego de su inoculación.

AGRADECIMIENTOS

El siguiente trabajo fue realizado con fondos de INTA provenientes del Proyecto Nacional PN-SUELO 1134044 y del Programa de Posgrado y Perfeccionamiento (Res. 1029/12).

BIBLIOGRAFÍA

Adesemoye, AO & JW Kloepper. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 1-12.

- Angelini, J; G Silvina; T Taurian; F Ibáñez; ML Tonelli; L Valetti; MS Anzuay; L Ludueña; V Muñoz & A Fabra. 2013. The effects of pesticides on bacterial nitrogen fixers in peanut-growing area. *Arch. Microbiol.* 195: 683-692.
- Anzuay, MS; O Frola; JG Angelini; LM Ludueña; A Fabra & T Taurian. 2013.
- Genetic diversity of phosphate-solubilizing peanut (*Arachis hypogaea* L.) associated bacteria and mechanisms involved in this ability. *Symbiosis.* 60: 143-154
- Aparicio, VC; E De Gerónimo; D Marino; J Primost; P Carrquiriborde & JL Costa. 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere.* 93: 1866-1873.
- Balthazor, TM & LE Hallas. 1986. Glyphosate degrading microorganisms from industrial activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 432-434.
- Bento, CP; X Yang; G Gort; S Xue; R van Dam; P Zomer; H Molf; CJ Ritsemaa & V Geissen. 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.
- Benslama, O & A Boulahrouf. 2013. Isolation and characterization of glyphosate-degrading bacteria from different soils of Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.* 49: 5587-5595.
- Bray, RR & L Kurtz. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59: 39-45.
- Chapman, HD. 1965. Cation exchange capacity. pp. 891-901, *In: C Black (ed).* Methods of Soil Analysis. Part 2. Agronomy Series No. 9. ASA, SSSA, Madison, WI.
- Chen, YP; PD Rekha; AB Arun; FT Shen; WA Lai & CC Young. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *App. Soil Ecol.* 34: 33-41.
- Cole, JR; B Chai; RJ Farris; Q Wang; SA Kulam; DM McGarrell; GM Garrity & JM Tiedje. 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 33(Database issue): D294-296.
- Creus, CM. 2017. Inoculantes microbianos: piezas de un rompecabezas que aún requiere ser ensamblado. *Rev. Arg. Microbiol.* 49: 207-209.
- Druille, M; M Omacini; RA Golluscio & MN Cabello. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi are directly and indirectly affected by glyphosate application. *Appl. Soil Ecol.* 72: 143-149.
- De Gerónimo, E; VC Aparicio; S Bárbaro; R Portocarrero; S Jaime & JL Costa. 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere.* 107: 423-431.
- Fan, J; G Yang; H Zhao; G Shi; Y Geng; T Hou & K Tao. 2012. Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58: 263-271.
- García, FO; LI Picone & IA Ciampitti. 2014. Fósforo. En: Fertilidad de suelos y fertilización de cultivos. 2da edn. pp. 229-259. Ediciones INTA.
- Gee, GW & JW Bauder. 1986. Particle-size analysis. *In: Klute, A. (ed.), Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and Mineralogical Methods. Agronomy Monograph No. 9, second ed.* ASA and SSSA, Madison, WI, 383-411.
- Gravuer, K., & A Eskelinen. 2017. Nutrient and rainfall additions shift phylogenetically estimated traits of soil microbial communities. *Frontiers Microbiol.* 8:1271.
- Guo, J; JR Cole; Q Zhang; CT Brown & JM Tiedje. 2015. Microbial community analysis with ribosomal gene fragments from shotgun metagenomes. *App. Environ. Microbiol.* 82: 157-166.
- Gupta, M; S Kiran; A Gulati; B Singh & R Tewari. 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiol. Res.* 167: 358-363.
- Hernández Guijarro, K; V Aparicio; E De Gerónimo; M Castellote; E Figuerola; JL Costa & L Erijman. 2018. Soil microbial communities and glyphosate decay in soils with different herbicide application history. *Sci.Total Environ.* 634: 974-982.
- Khan, MS; A Zaidi & E Ahmad. 2014. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. En: MS Khan; A Zaidi; J Musarrat (eds.). Phosphate Solubilizing Microorganisms. pp 31-62. Springer. Cham.
- Khan, AA; G Jilani; MS Akhtar; SMS Naqvi & M Rasheed. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: Occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J. Agric. Biol. Sci.* 1: 48-58.
- Kryuchkova, YV; GL Burygin; NE Gogoleva; YV Gogolev; MP Chernyshova; OE Makarov; EE Fedorov & Turkovskaya OV. 2014. Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. *Microbiol Res.* 169: 99-105.
- Lane, DJ; B Pace; GJ Olsen; DA Stahl; ML Sogin & NR Pace. 1985. Rapid-determination of 16S ribosomal-RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82: 6955-6959.
- Li, H; JQ Su; XR Yang & YG Zhu. 2019. Distinct rhizosphere effect on active and total bacterial communities in paddy soils. *Sci. Total Environ.* 649: 422-430
- Moneke, AN; GN Okpala & CU Anyanwu. 2010. Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 4067-4074.

- Morales- García, YE; D Juárez Hernández; C Aragón Hernández; MA Mascarua Esparza; MR Bustillos Cristales; LE Fuentes-Ramírez; RD Martínez-Contreras & J Muñoz-Rojas. 2011. Growth response of maize plants inoculated with *Enterobacter* spp. as a model for alternative agriculture. *Rev. Arg. Microbiol.* 43: 287-293.
- Nautiyal, SC; S Bhaduria; P Kumar; H Lal; R Mondal & D Verma. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiol Lett.* 182: 291-296.
- Nelson, DW & LE Sommers. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. *Am. Soc. Agron.* 9: 539-579.
- Newman, MM; N Hoilett; N Lorenz; RP Dick; MR Liles; C Ramsier & JW Kloepper. 2016. Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. *Sci Total Environ.* 543: 155-160.
- Pérez-Montano, F; C Alías-Villegas; RA Bellogín; P del Cerro; MR Espuny; I Jiménez-Guerrero; FJ López-Baena; FJ Ollero & T Cubo. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiol. Res.* 169: 325-336.
- Pipke, R & N Amrhein. 1988. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1293-1296.
- Primost, JE; DJG Marino; VC Aparicio; JL Costa & P Carriquiriborde. 2017. Glyphosate and AMPA, "pseudo-persistent" pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environ. Pollut.* 229: 771-779.
- Pizzul, L; MP Castillo & J Stenstrom. 2009. Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation.* 20: 751-759.
- Rösig, ML. 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, ML; BB Brightwell; J Schaefer & JT Marvel. 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *J. Agric. Food Chem.* 25: 517-528.
- SAS 2009. SAS Institute Inc. "SAS/STAT® 9.2. User's Guide," 2nd Edition, SAS Institute Inc., Cary, 2009.
- Sviridov, AV; TV Shushkova; IT Ermakova & AA Leontivsky. 2015. Microbial degradation of glyphosate herbicides. *Appl. Biochem. Microbiol.* 51: 183-190.
- Tamura, K; G Stecher; D Peterson; A Filipinski & S Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Ternan, NG; JW Mc Grath; G Mc Mullan & JP Quinn. 1998. Organophosphonates: Occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 635-647.
- Tilman, D; KG Cassman; PA Matson; R Naylor & S Polasky. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature.* 418: 671-677.
- Viruel, E; ME Lucca & F Siñeriz. 2011. Plant growth promotion traits of phosphobacteria isolated from Puna, Argentina. *Arch. Microbiol.* 193: 489-496.
- Walpolá, B; WS Kong & MH Yoon. 2013. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Pantoea* strains. *Korean J. Soil Sci. Fer.* 46: 494-501.
- Wang, YJ; DM Zhou & RJ Sun. 2005. Effects of phosphate on the adsorption of glyphosate on three different types of Chinese soils. *J Environ. Sci.* 17:711-715.
- Watanabe, FS & SR Olsen. 1965. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorous in water and NaHCO₃ extracts from soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 29: 677-678.
- Zabaloy, MC & MA Gómez. 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.
- Zaidi, A; MS Khan; M Ahemad & M Oves. 2009. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 56: 263-284.
- Zaller, JG; F Heigl; L Ruess & A Grabmaier. 2014. Glyphosate herbicide affects belowground interactions between earthworms and symbiotic mycorrhizal fungi in a model ecosystem. *Sci. Rep.* 4: 5634.