



TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Utilización de indicadores microbiológicos para evaluar  
la sostenibilidad de sistemas productivos agrícolas**

2022

**Juan Manuel Ruiz-Eskuide Introini**

**Tutora : Natalia Bajsa**

Laboratorio Ecología Microbiana

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE-MEC)

## CONTENIDO

<b>1) Introducción</b>	<b>2</b>
1.1) Tecnología vinculada al cultivo de soja transgénica	2
1.2) Salud y microorganismos del suelo	3
1.3) Degradación del glifosato en el suelo	5
<b>2) Objetivo General</b>	<b>5</b>
2.1) Objetivos Específicos	5
<b>3) Estrategia</b>	<b>6</b>
<b>4) Materiales y Métodos</b>	<b>6</b>
4.1) Toma de muestras de suelo	6
4.2) Ensayo de aplicación de glifosato	6
4.3) Capacidad de Campo (CC)	7
4.4) Recuento en placa de bacterias	8
4.5) Respiración microbiana	8
4.6) Biomasa Microbiana	9
4.7) Determinación de humedad	9
4.8) Análisis Estadísticos.	10
<b>5) Resultados</b>	<b>10</b>
5.1) Indicadores microbiológicos en suelos de predios agrícolas	10
5.2) Efecto del glifosato sobre la comunidad microbiana del suelo	13
<b>6) Discusión</b>	<b>16</b>
6.1) Indicadores microbiológicos en suelos de predios agrícolas	16
6.2) Efecto del glifosato sobre la comunidad microbiana del suelo	18
<b>7) Conclusiones</b>	<b>20</b>
<b>8) Bibliografía</b>	<b>22</b>
<b>9) Anexo</b>	<b>27</b>

## 1) Introducción

La situación actual de los suelos en Uruguay es entendible en el marco de una transformación profunda de su uso, proceso que comienza con fuerza a inicios de la década del 2000 y que crece sostenidamente desde entonces (Arbeletche y Gutiérrez, 2010). Este proceso se basa en un cambio en la matriz del sistema productivo “tradicional” uruguayo, conformado por la ganadería extensiva mixta (ovina-bovina), así como los cultivos de cereales tradicionales como el trigo, cebada, avena, maíz y sorgo por sistemas de cultivos transgénicos (soja y maíz), o forestal de rápido crecimiento (*Eucalyptus*) acompañados de una expansión del área destinada a la siembra de arroz (Achkar et al., 2006). Estos tipos de cultivos no sólo cambian el paisaje rural del Uruguay en cuanto a su cobertura vegetal, sino que inciden en la estructura económica y social, conduciendo a procesos de desplazamiento de pequeños y medianos productores, debido a una sucesiva concentración y extranjerización de grandes extensiones de tierra. Dicho proceso provocó un cambio de paradigma en el cómo se conciben los cultivos temporalmente, desde un pasaje de agricultura rotativa de cultivo-pasturas con un uso marginal de fertilizantes y herbicidas hacia una agricultura continua sin rotación, mayoritariamente de zafra veraniega y con un elevado uso de agroquímicos, fenómeno conocido como intensificación agrícola (Achkar et al., 2006).

### 1.1) Tecnología vinculada al cultivo de soja transgénica

*Glycine max*, comúnmente conocida como soja, es una especie nativa de Asia de la familia Fabaceae (leguminosas) (Hymowitz y Newell.,1981). En sus nódulos radiculares mantiene una asociación endosimbiótica con bacterias del género *Rhizobium*, capaces de fijar biológicamente nitrógeno (FBN) (Galeano., 2017). Tanto la producción de aceites para consumo humano, como la venta de granos para alimentación ganadera son las principales razones de la masificación de este monocultivo, cuyo principal destino de exportación es el mercado Chino, que en el 2019 totalizó 1,4 toneladas exportadas (Presidencia de la República., 2019).

En la práctica, un monocultivo de soja plantado mediante siembra directa, es intensivo en maquinaria pesada, fertilizantes y plaguicidas. La maquinaria utilizada consta generalmente de sembradoras, pulverizadoras y cosechadoras; las primeras realizan una siembra directa o sea que no existe labranza o arado de la tierra (Presidencia de la República., 2016).

El principal fertilizante utilizado en la producción de soja es el superfosfato simple (SPS) o también denominado “arrancador”, porque se aplica al momento de la siembra de soja aportando P (fósforo), S (azufre) y Ca (calcio) (Hoffman., 2013). Los principales fertilizantes nitrogenados son la urea, el nitrato amónico, el amoníaco y el sulfato amónico. Éstos no son recomendados en el cultivo de soja, ya que si bien generan un mayor crecimiento de las hojas, no promueven la nodulación y Fijación Biológica Nitrógeno (FBN), provocando una afección sistémica a la planta, que impide el correcto desarrollo de todos sus estadios fenológicos, especialmente en aquellos más sensibles a la FBN (R1 a R5)(Ferraris et al., Salvagiotti et al., 2009).

De los diferentes compuestos plaguicidas aplicados en los monocultivos de soja el más utilizado es el glifosato. Este herbicida de amplio espectro se aplica en las hojas de hierbas y arbustos (malezas) permitiendo su erradicación en los cultivos debido a

que interfiere con la síntesis de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano, provocando la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) (Funke et al., 2006). La soja RR es tolerante a este herbicida debido a la introducción por transgénesis de una EPSPS bacteriana que no es blanco del glifosato. Si bien se conoce la incidencia específica que tiene el glifosato en las vías bioquímicas vegetales, no se comprende el impacto que tiene de forma inespecífica sobre la planta a la que se le aplica, así como sobre otro tipo de organismos (Funke et al., 2006).

## **1.2) Salud y microorganismos del suelo**

Los suelos son generados por la desintegración física y química de las rocas, así como por los procesos biológicos que allí residen. La salud o calidad del suelo puede definirse ampliamente como la capacidad de un suelo vivo para funcionar, dentro de los límites de un ecosistema natural o manejado, para sustentar la productividad vegetal y animal, mantener o mejorar la calidad del agua y el aire, y promover la salud vegetal y animal (Doran et al., 2002).

La salud del suelo se encuentra determinada por sus características físicas, químicas y biológicas, a partir de las que se construyen los indicadores de salud (IS). Un indicador ideal debería correlacionarse bien con los procesos del ecosistema e integrar propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, ser accesible para muchos usuarios, ser sensible al manejo y el clima (Doran y Parkin, 1996). Los indicadores de salud de los suelos no son generalizables, porque dependen del tipo de suelo, manejo y condiciones ambientales (Cardoso et al., 2013)

Los IS físicos explican la estructura que puede adoptar un suelo, mediante su agregación, textura, porosidad, densidad aparente y humedad, pudiendo dar cuenta de procesos de compactación. Los indicadores químicos, como el contenido de Carbono (C), Nitrógeno (N) y materia orgánica del suelo, se relacionan con la Capacidad de Intercambio Catiónico posibilitando la retención de nutrientes minerales (K, N, Mg y Na) e impidiendo los procesos de lixiviación (Stevens 2018).

En última instancia, la macro/mesofauna del suelo, C y N de la biomasa microbiana, su biodiversidad, las enzimas del suelo, la respiración microbiana entre otros, integran el grupo de indicadores biológicos. Estos últimos presentan una rápida respuesta a los cambios ambientales, y por tanto son cruciales para medir los impactos generados por el cambio del uso de suelos en un breve periodo de tiempo. La abundancia de bacterias heterótrofas totales presentes en un suelo constituye un indicador de su calidad; ya que empíricamente responde ante los cambios temporales, ambientales, y en particular, al de los sistemas productivos (Martínez et al, 2018). En un estudio de cuatro años llevado a cabo en Estonia se halló que la cantidad de bacterias totales reacciona positivamente en relación a años más cálidos, dadas las condiciones de frío existentes en esas latitudes. Además que el agregado de enmiendas, en ese caso estiércol de vaca, en conjunto con una rotación de cultivos orgánicos genera un aumento del número de bacterias totales (Järvan et al., 2014).

El filo Actinobacteria es un vasto grupo heterogéneo de microorganismos gram positivos/variables, con una elevada capacidad metabólica, que les permite usar diversas fuentes de energía y carbono. Existen especies autótrofas, heterótrofas, quimiótrofas o fotótrofas, pudiendo ser tanto aerobias como anaerobias, permitiéndoles habitar en la mayoría de los nichos ecológicos terrestres, aunque con cambios importantes en su composición y abundancia. La representación que tienen

en relación al total de microorganismos en un ambiente, es de un 1% en la superficie de los océanos y 5% en sus profundidades; con mayor preponderancia en ambientes terrestres secos(60%) que en húmedos(20%) (Battistuzzi y Hedges, 2009).

El ciclo de vida de las actinobacterias se separa, a grandes rasgos, en dos fases: una inactiva con esporas en dormición, y otra activa con un crecimiento tipo micelar filamentoso en donde desarrollan varias funciones claves para la salud de los suelos. Una de ellas es la descomposición de materia orgánica, realizada en conjunto con hongos, fundamental para la disponibilidad y reciclaje de sus componentes; esa función la realizan debido a la producción de diversas enzimas hidrolíticas y ligninolíticas. Otro rol clave que desempeñan, es la modulación de las comunidades microbianas mediante la producción de metabolitos secundarios con propiedades antibióticas que afectan a los demás microorganismos (antagonismo), por consiguiente regulan tanto su concentración como composición (Parada et al., 2017).

La biomasa microbiana del suelo es la parte viva de la materia orgánica del suelo, formada por hongos, bacterias y protozoarios, que se encuentra en un estado de ciclado continuo de la materia orgánica (Sicardi et al., 2004). De esa forma el rol que juegan los microorganismos del suelo en la retención y liberación de nutrientes determinan en gran parte su flujo a través del sistema. Es por eso que una estimación de la biomasa microbiana puede contribuir a la comprensión de la calidad y fertilidad de un suelo, ya que sin necesariamente indicar causalidad, sí presenta correlación con características positivas del mismo. En estudios realizados en Uruguay y Austria, se mostró que al aumentar las enmiendas orgánicas de vinaza y lodos ganaderos respectivamente, hubo un aumento significativo en la biomasa microbiana así como en los niveles de mineralización del N, como consecuencia del aumento de bacterias amonificantes. La transformación de nitrógeno orgánico a inorgánico generada por dichas bacterias promueve una mayor disponibilidad y asimilación por parte de las plantas que no pueden incorporar nitrógeno en otro estado, lo que también es un factor sumamente importante para el crecimiento de la biomasa (Senatore et al., 2013; Kandeler et al., 1994).

Además de la biomasa microbiana, la respiración microbiana es otro indicador que mide la actividad metabólica de un determinado suelo. Este es muy sensible, debido a que presenta grandes oscilaciones dependiendo de la disponibilidad de sustratos, humedad y temperatura, por lo tanto es relevante medirlas en condiciones controladas (Cardoso et al., 2013). Las alteraciones en la respiración pueden deberse a cambios en la materia orgánica del suelo (cambios en la cobertura vegetal), la composición propia del suelo (tipos de suelo), así como el impacto de la utilización de los xenobióticos, en éste último caso frecuentemente resulta en la disminución de la respiración. Igualmente la interpretación no siempre es lineal, ya que puede ser que el xenobiótico sea fuente de energía para la microbiota capaz de degradar dicho compuesto (Bozzo et al., 2010).

Generalmente en los suelos de uso agrícola, los manejos de bajo impacto resultan en una mayor respiración y por tanto mayor actividad microbiana, pero esa actividad también se encuentra sujeta a la cantidad y calidad de materia orgánica aportada. En un estudio se midió el impacto del glifosato en predios con agricultura continua y siembra directa, con una historia de 13 años de aplicación. La respiración microbiana se vió afectada significativamente 9 días después de la tercera aplicación de glifosato, liberándose un 52,8% más de CO<sub>2</sub> en el control que en el tratado. Luego de llegar al día 16 de la tercera dosis, yá no se mostraban diferencias significativas lo que indica la

circunstancialidad en el comportamiento de la respiración microbiana (Bozzo et al., 2010).

### **1.3) Degradación del glifosato en el suelo**

Existen varios factores que determinan el movimiento del glifosato a través de los horizontes del suelo, así como su capacidad de éste último para llevar a cabo procesos de adsorción, degradación química y biológica. La adsorción en la matriz del suelo se da principalmente por el contenido de minerales secundarios (arcillosos) y de humus, que aportan la característica carga negativa a la matriz del suelo, otorgándole la Capacidad de Intercambio Catiónico. Esto promueve la adsorción de diferentes iones (como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}$ ,  $\text{Na}^+$ ) así como compuestos químicos, entre ellos el glifosato, que ven reducida su disponibilidad a una posible degradación biológica (Zabaloy et al., 2011; FAO, 2021).

La capacidad de los microorganismos para degradar glifosato está determinada por la batería enzimática que poseen. Existen dos vías fundamentales que determinan su degradación, ya sea como fuente de energía o como fuente de fósforo. En la primera el clivaje del enlace carbono-fósforo se da por medio de la enzima C-P liasa, con la concomitante formación de sarcosina, que continúa su degradación hasta catabolizarse en  $\text{CO}_2$ , en conjunto con la liberación de fosfato inorgánico (Pi) (Hove-Jensen et al., 2014). La segunda, en donde la enzima glifosato deshidrogenasa rompe el enlace C-N, catalizando la conversión de glifosato hacia 2 metabolitos, ácido aminometilfosfónico (AMPA) y glioxilato, siendo el primero catabolizado a través de una acetilación y una posterior ruptura del enlace C-P (C-P liasa), mientras el segundo entra al ciclo del glioxilato y es degradado a  $\text{CO}_2$  (Anexo, Figura 8)(Hove-Jensen et al., 2014). En el estudio de Kryuchkova et al.(2014) aislaron 10 cepas con resistencia al glifosato encontrando una cepa *Enterobacter cloacae* K7 capaz de utilizar el glifosato como fuente de P.

Los hongos también cumplen un destacado papel como degradadores de glifosato. En un estudio se evaluó el crecimiento, así como las principales vías de degradación presentes en *Trichoderma viridae*, *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*, en donde el glifosato fué utilizado principalmente como fuente de fósforo y en una menor medida como fuente de nitrógeno por dichas especies (Adelowo et al., 2014).

En suma, tanto la composición físico-química como la del microbioma presente en el suelo, definen las principales vías de degradación del glifosato. Si es utilizado como fuente de carbono y energía, desencadena un crecimiento en esa población bacteriana; si es degradado a expensas de un sustrato que provea de carbono y energía, co-metabolismo, la degradación del herbicida no incide en el crecimiento de la biomasa microbiana (Zabaloy et al, 2011).

## **2) Objetivo General**

Analizar el impacto de la intensidad de uso del suelo en sistemas agrícolas, sobre las comunidades microbianas.

### **2.1) Objetivos Específicos**

- Determinar la abundancia y actividad microbiana en suelos de predios agrícolas con diferentes sistemas de cultivo.
- Evaluar el efecto de la aplicación del herbicida glifosato sobre la comunidad microbiana del suelo.

### **3) Estrategia**

El estudio consistió en analizar muestras de suelo colectadas de 70 predios agrícolas durante la implantación de un cultivo de soja. Se seleccionaron predios con diferente intensidad de uso del suelo: agricultura continua o pasturas en la rotación, y con diferente intensidad de aplicación de herbicidas.

Las muestras fueron analizadas mediante indicadores microbiológicos, como poblaciones de actinobacterias y bacterias heterótrofas aerobias, actividad (respiración) microbiana y biomasa microbiana. Esta tesis se enmarca en el proyecto “Evaluación y rediseño de sistemas agrícolas en base a indicadores de calidad”, en el cual se estudia la intensificación agrícola, a través del historial de cultivo de los diferentes predios, así como los respectivos herbicidas y otros pesticidas aplicados. También se analizaron las características fisicoquímicas, conformadas por un análisis textural, en porcentajes de arena, limo y arcilla, así como el pH, porcentajes de carbono y materia orgánica (Financiado por FSA-ANII; Responsable: Oswaldo Ernst, Facultad de Agronomía - UDELAR).

En una segunda instancia se analizó el efecto de la aplicación de glifosato sobre la microbiota del suelo, bajo condiciones controladas, a razón de evitar la variabilidad característica de las condiciones de campo. Para ello se hizo un ensayo en macetas en donde se analizaron la biomasa y respiración microbiana así como un recuento de actinobacterias y bacterias heterótrofas, para tratamientos con y sin aplicación de glifosato.

### **4) Materiales y Métodos**

#### **4.1) Toma de muestras de suelo**

Los muestreos se realizaron en predios productivos ubicados en los Departamentos de Colonia, Soriano, Paysandú y Rio Negro durante la zafra 2020/2021 (Anexo, Figura 9). Los predios fueron agrupados de acuerdo al manejo agrícola realizado: por el grado de rotación con pasturas y el cultivo previo respecto al cultivo de soja. Todos aplican fertilizantes y herbicidas para siembra directa y control de malezas. Se recabó información del manejo desde los cultivos de invierno del año 2015 hasta la fecha de muestreo. En cada predio se colectaron muestras compuestas de 10-15 tomas a 10 cm de profundidad con un barreno al inicio del verano, en estadios fenológicos tempranos (v2-v3) del cultivo de soja. Las muestras fueron tamizadas y conservadas a 4°C y a -20°C hasta el momento de su análisis.

#### **4.2) Ensayo de aplicación de glifosato**

El ensayo se realizó con 5 réplicas por tratamiento, con Glifosato (comercial) y Control con agua; se sembraron 4 semillas de soja variedad Tec Irga 6070 RR (Fadisol) resistente al herbicida glifosato por maceta (1 litro). Para el sustrato se utilizó suelo proveniente de un predio con cultivo orgánico de hortalizas, sin historia reciente de uso de herbicidas, que fue tamizado y mezclado con perlita en una proporción de 2:1 (suelo:perlita).

Se realizaron 2 aplicaciones de glifosato , la primera el mismo día de la siembra, y la segunda 10 días después. Las soluciones del herbicida se hicieron con sal de isopropilamina 480 g/L (41% del peso) equivalente a 360 g/L (31% del peso) de glifosato en un formato soluble. Se preparó la primera aplicación de glifosato al 4% equivalente a 6 L/ha y la última de 2% equivalente 3 L/ha; cada una de las aplicaciones fueron de 100 ml por maceta (Conde.,2011).

La inoculación con rizobios se hizo al día 8 con dos cepas de *Bradyrhizobium elkanii*, U1302 y U1301, crecidas en medio TY (triptona - extracto de levadura), por 24-48h hasta alcanzar una Densidad Óptica (D.O) a 660 nm de 0,36. Luego se calculó el factor de dilución para obtener una suspensión de aprox.  $1 \times 10^7$  UFC/mL de cada cepa en NaCl 0,9 M. Finalmente se aplicó 1 ml de la suspensión por plántula en ambos tratamientos, Glifosato y Control.

**Tabla 1-** Cronograma con las actividades del ensayo de aplicación de glifosato.

Fecha	Actividad
19/11/21	Siembra y 1era aplicación de glifosato. (4% → 100 ml por réplica)
26/11/21	Emergencia de los plantines, homogeneización por tamaño. Inoculación con rizobios.
29/11/21	2da aplicación de glifosato (2% → 100 ml por réplica)
6/12/21	Recolección del suelo y cosecha de las plantas en estadio fenológico V3

Luego de la emergencia de los plantines se procedió a dejar uno solo por maceta, mediante raleo, homogeneizando los mismos por tamaño y estadio fenológico. Se dejaron crecer por un total de 4 semanas antes de proceder a la recolección del suelo no rizosférico y a la cosecha de las plantas, a las cuales se les retiró el suelo de las raíces usando agua (Anexo, Fig 11).

Las muestras de suelo se almacenaron en cámara fría (4°C) y en un congelador (-20 °C). Para los análisis de determinación de humedad, capacidad de campo, enumeración de bacterias y respiración microbiana se usaron las muestras refrigeradas, mientras que para el análisis de biomasa microbiana las muestras congeladas.

Para el caso de las plantas se separó la parte radicular y aérea de cada una de las plantas, fueron colocadas en una estufa a 105 °C por 48 hrs, para luego ser enfriadas en desecador y pesadas.

#### **4.3) Capacidad de Campo (CC)**

Se pesaron 10 g de suelo en placas petri de vidrio (anotando primero el peso de la placa sin nada) y se dejaron secar en estufa a 105°C durante 48 h, fueron retiradas con cuidado, dispuestas en un desecador para que se enfríen y pesadas nuevamente, restando el peso de la placa al total, para tener únicamente el peso del suelo seco. Por otro lado se pesaron 10 g de suelo en vasos de plástico, con sus bases agujereadas



permeables al agua y con papel absorbente por debajo, para luego ser saturadas de agua. Se dejaron secar hasta que el papel absorbente se encontró seco al tacto, pero el suelo aún húmedo (100% de la CC), y fueron pesadas. Finalmente se hizo la resta entre el peso de la muestra saturada de agua y seca, diferencia que representa la máxima cantidad de agua que una determinada muestra puede contener.

#### **4.4) Recuento en placa de bacterias**

Para determinar el número de bacterias cultivables pertenecientes a diferentes grupos en cada muestra, se suspendieron 5 g de suelo en 45 ml de pirofosfato de sodio 0,1% (p/v) estéril y se agitaron a 150 rpm durante 30 minutos. Esta suspensión se diluyó en forma seriada hasta  $10^{-5}$ . El número de bacterias heterótrofas totales fue determinado mediante la siembra de 10  $\mu$ l en gota por triplicado de las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  en placas de Petri con el medio Tryptic Soy Agar 1/10 Difco® (TSA 1/10) suplementado con cicloheximida 100  $\mu$ g/ml (Smit et al., 2001). Para el caso de las actinobacterias, se sembraron en superficie 100  $\mu$ l de las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  en placas de Petri utilizando el medio Starch Casein Agar (SCA) suplementado con cicloheximida 100  $\mu$ g/ml (Leoni y Ghini, 2003).

Las placas se incubaron a 25 °C, realizando un conteo preliminar de heterótrofas totales a las 48 h y el definitivo, para ambos grupos de bacterias, a los 7 días. Las colonias típicas de actinobacterias se caracterizan por permanecer adheridas al medio de cultivo luego de pasar un algodón por la superficie.

#### **4.5) Respiración microbiana**

La actividad de los microorganismos fue estimada midiendo el proceso de respiración, o sea la cantidad de CO<sub>2</sub> liberado por las muestras de suelo, a través de su captación mediante NaOH y su respectiva cuantificación por retrotitulación.

Se incubaron 25 g de suelo para cada muestra, a las muestras de los predios agrícolas se les ajustó la humedad a 75% de la capacidad de campo. La misma se calculó a partir de la humedad de las muestras, y cuánto representa el 75% de la CC; la diferencia entre ambas es lo que se agregó de agua a cada muestra.

La muestra de suelo y la solución de NaOH 0,25 N se colocaron en recipientes separados, y se incubaron dentro de un recipiente hermético a 25°C por 48h. Se realizó la retrotitulación con una solución de HCl (0,1 N) del CO<sub>2</sub> captado por la solución de NaOH, y utilizando fenolftaleína como indicador se agregaron tres gotas a la solución de NaOH (Anderson, 1985).

En última instancia se contabilizó la cantidad (ml) de HCl necesarios para el pasaje de rosado, característico de la fenolftaleína, a transparente en dicha solución. Dicha cantidad se multiplicó por el factor de dilución del HCl(0,979) y 0,1 para llegar a los miliequivalentes(meq) de ácido. Siendo cada unidad de meq igual a 6 mg de CO<sub>2</sub> eso en 25 g de suelo, que se multiplicó por el factor de humedad de cada muestra, para obtener el equivalente en gramos de suelo seco(ss). En última instancia se transformaron las unidades y se expresaron en mg CCO<sub>2</sub>/kg ss.

#### **4.6) Biomasa Microbiana**

Se estimó la biomasa microbiana mediante el método de fumigación-extracción (Vance et. al., 1987). Este método consiste en lisar las células de los microorganismos por fumigación con cloroformo y extraer la biomasa con una solución de sulfato de potasio. El C presente se cuantifica por oxidación con dicromato de potasio y ácido sulfúrico, midiendo colorimétricamente la formación de  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ . La estimación de la biomasa surge de la diferencia entre el suelo sin fumigar, donde se mide el carbono que no está en las células, y el fumigado, que considera además el carbono de los microorganismos lisados.

Inicialmente, y para cada una de las muestras, se pesaron 10 g de suelo en placas petri por duplicado, una para la muestra que fue sometida a fumigación y otra que no.

Para las muestras que fueron fumigadas, en un desecador de vidrio con un mecanismo que permite sellar al vacío, se dispuso un recipiente con cloroformo en el fondo. Se puso el fondo falso y sobre el mismo placas de petri conteniendo las muestras de suelo, se cerró la tapa con vaselina en los bordes para asegurar un buen sellado y se procedió a generar un vacío mediante una bomba. Después de una incubación sin luz de 24 hs y a 25 °C en una atmósfera saturada con cloroformo, se retiraron las muestras fumigadas. Paralelamente, las muestras no fumigadas se dejaron en placas Petri a temperatura ambiente.

El carbono de las muestras, tanto las fumigadas como las no fumigadas, se extrajo colocándolas en una solución de 50 mL de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,5 M e incubándolas en un agitador por 30 minutos a 25 °C y 180 rpm. Se filtraron (papel *Whatman n°42*) y se obtuvieron sus respectivos extractos, a los cuales se les ajustó el pH entre 6.5 y 6.8, con una solución de NaOH 0,01 M.

A 4 mL de cada extracto se agregó 1 mL de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0,0667 M. Después se le agregaron 5 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y se dejaron incubando 24 hs a temperatura ambiente. Al día siguiente se procedió se midió la absorbancia a 600 nm.

Se realizó una curva de calibración con una Solución Madre (SM) de glucosa 180 g/mol equivalente a 72 g/mol de carbono, con una concentración final de carbono 75 mg/mL. Se hicieron diluciones de SM en una solución de sulfato de potasio 0,5 M, de ellas se extrajeron 4 mL para mezclar con 1 mL de la solución  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (0,0667 M) y 5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Luego de un periodo de incubación a temperatura ambiente por 24 hr, se midió la absorbancia para cada una de las diluciones, conformado la curva de calibración absorbancia vs mgC/L (Anexo, Figura 11). Se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos para las muestras de suelo en la curva de calibración, obteniendo su correspondiente valor en mg C/L.

#### **4.7) Determinación de humedad**

Para corregir los valores de las variables medidas en cada una de las técnicas realizadas se determinó el porcentaje de humedad, secando 10 g de suelo en una estufa a 105°C durante 48 h, pesando nuevamente y calculando la masa de agua perdida (Frioni, 2006).

#### **4.8) Análisis Estadísticos.**

Todos los resultados fueron corregidos por el contenido de humedad, por lo que todos los análisis se expresaron por gramo de suelo seco. En el caso de los recuentos de actinobacterias y heterótrofas, se expresaron como logaritmo del número de células bacterianas.

Los resultados derivados de los cuatro análisis realizados a las muestras de suelo obtenidas del ensayo en invernadero fueron sometidos a las siguientes pruebas estadísticas en Rstudio: test de Shapiro-Wilks para comprobar la distribución normal de los datos ( $p$ -valor  $> 0,05$ ), el test de Levene's para evaluar la homogeneidad de las varianzas ( $p$ -valor  $> 0,05$ ), y Análisis de Varianza (ANOVA) para evaluar la diferencia entre las medias de las variables para cada tratamiento.

Los resultados derivados de los cuatro análisis realizados a las muestras de suelo de los predios fueron sometidos a análisis multivariados de componentes principales y de correlación de Pearson utilizando InfoStat. Para ello se utilizó una matriz de datos con los resultados de los análisis microbianos por predio, como también variables categóricas : 1) entre predios que realizan rotación con pasturas o agricultura continua sin rotación y 2) tipo de cultivo anterior al de soja, pudiendo ser pastura u otro cultivo agrícola.

En el caso de la correlación de Pearson, además de los valores de los análisis microbianos, se utilizaron resultados de pH y % de Materia orgánica (%MO) obtenidos en el proyecto FSA-ANII (Responsable: Oswaldo Ernst, Facultad de Agronomía - UDELAR) donde se enmarca esta tesis.

### **5) Resultados**

#### **5.1) Indicadores microbiológicos en suelos de predios agrícolas**

Los valores obtenidos para los indicadores en cada uno de los predios se encuentran detallados en el anexo (Anexo, Tabla 4). Los valores máximos, mínimos y promedios calculados para cada uno de los indicadores se presentan en la tabla 2. Se destacan las diferencias en órdenes de magnitud (de uno a dos) entre los valores máximos/mínimos para carbono de biomasa microbiana (CBM), actinobacterias, bacterias heterótrofas y respiración. En el caso del pH se destaca la preponderancia de predios con suelos ácidos, promediando entre todos 5,24, con mínimo de 4,06 y un máximo por arriba del pH neutro de 7,52.

**Tabla 2-** Promedio, valor máximo y mínimo de los análisis realizados, para todos los predios estudiados. Se expresan: La abundancia de bacterias heterótrofas en Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo seco (UFC/g S.S); La abundancia de actinobacterias (UFC/g S.S); La actividad microbiana medida como respiración en miligramos de carbono respirados por kilogramo de suelo seco (mg C-CO<sub>2</sub>/Kg S.S); El carbono en la biomasa microbiana expresado en miligramos de carbono por gramo de suelo seco (mg C/g S.S); El pH en unidades de pH y el porcentaje de materia orgánica (%MO) en relación al total del suelo.

Muestras	Biomasa(mg C/g S.S)	Hetero (UFC/g S.S)	Actino (UFC/g S.S)	Respiración (mg C-CO <sub>2</sub> /Kg S.S)	pH	%MO
<b>Promedio</b>	0,31087	8,99E+07	8,80E+06	6,59	5,25	5,38
<b>Valor máximo</b>	0,72366	3,38E+08	1,80E+07	25,39	7,52	8,96
<b>Valor mínimo</b>	0,08837	1,15E+07	5,90E+05	0,38	4,06	3,32

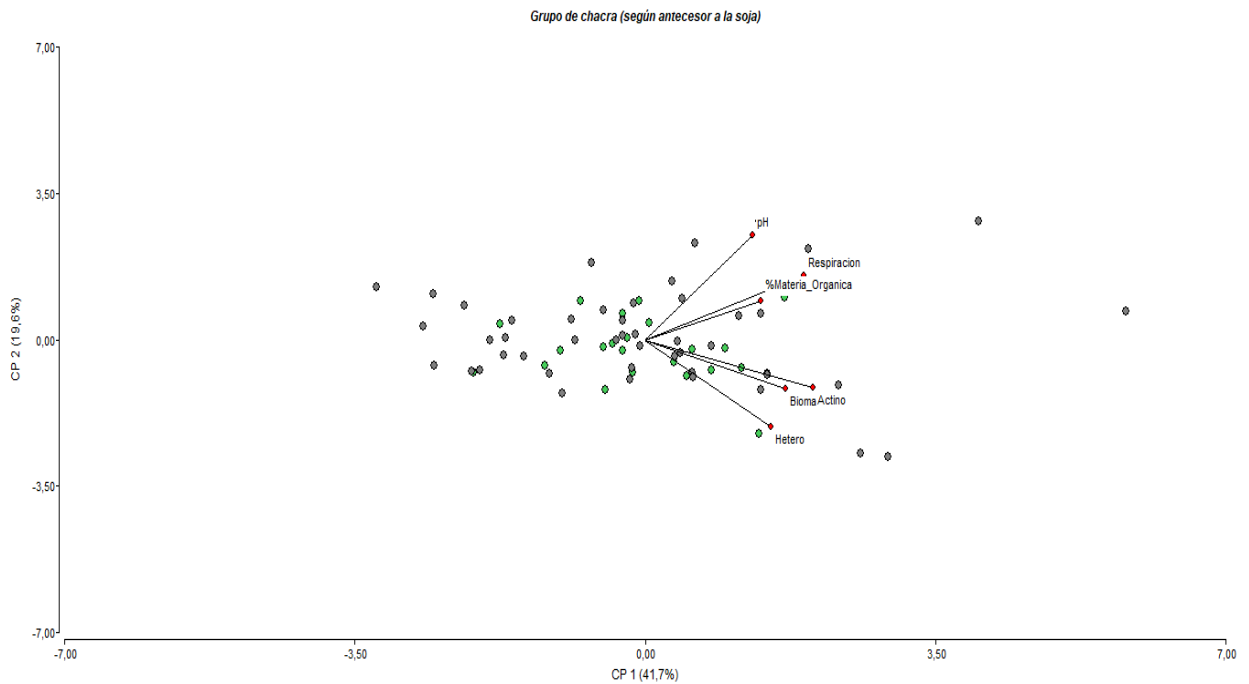
**Tabla 3-** Resultados del análisis de correlación de Pearson entre variables evaluadas. En la parte superior, arriba de la línea simétrica, se muestran los valores de correlación de Pearson, entre variables indicadores, para los 70 predios(n) muestreados. En la parte inferior de la matriz se muestra el nivel de significancia (p-valor) destacado en rojo cuando es significativo (p-valor<0,05).

	Biomasa	Heterótrofas	Actinobacterias	Respiración	pH	%Materia Orgánica
Biomasa	1	0,32	0,45	0,32	0,09	0,3
Heterótrofas	p-valor = 0,0062	1	0,53	0,22	0,08	0,08
Actinobacterias	p-valor = 0,0001	p-valor = 0,0001	1	0,42	0,21	0,27
Respiración	p-valor = 0,0065	p-valor = 0,0641	p-valor = 0,0003	1	0,51	0,34
pH	p-valor = 0,4701	p-valor = 0,4864	p-valor = 0,0755	p-valor = 0,0001	1	0,19
%Materia Orgánica	p-valor = 0,0121	p-valor = 0,4916	p-valor = 0,0217	p-valor = 0,0036	p-valor = 0,1183	1

Se realizó un análisis de correlación entre las variables medidas por el coeficiente de Pearson. Para el caso de la biomasa la correlación de Pearson fue significativa con todas las variables, exceptuando pH; además tiene una correlación positiva (Pearson 0,30 a 0,50) con todas las otras variables significativas (tabla 3). Asimismo la abundancia de actinobacterias también presentan una correlación significativa con todas las variables excepto pH; dicha correlación es más heterogénea dependiendo de la variable, por ejemplo guarda una correlación positiva con bacterias heterótrofas (Pearson 0,53), de 0,45 con biomasa, 0,42 con respiración, 0,27 con materia orgánica y 0,21 pH. Las bacterias heterótrofas sólo tienen correlación significativa (Pearson 0,32) con biomasa, y (Pearson 0,53) con actinobacterias.

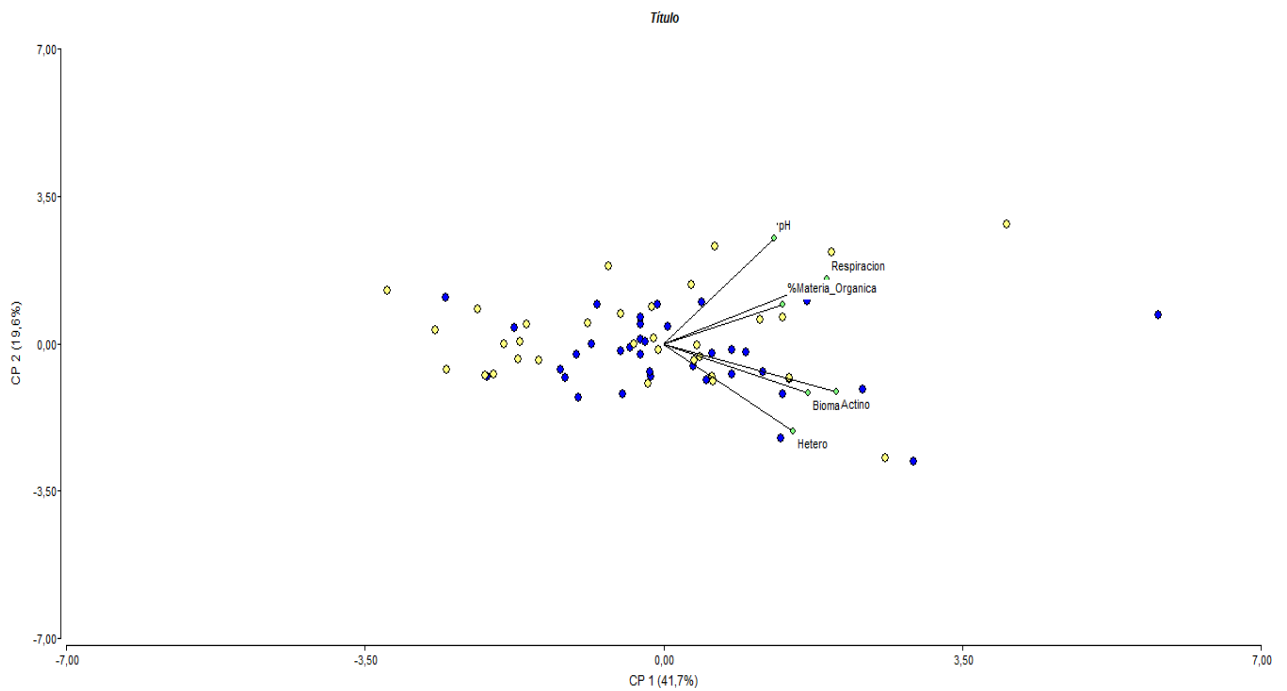
Otro resultado es la correlación significativa existente entre la respiración y el pH (Pearson 0,51), como también de 0,42 entre la primera y las actinobacterias. Por último la correlación significativa y positiva entre casi todas las variables biológicas (biomasa, actinobacterias, heterótrofas y respiración).

El pH tiene una correlación significativa de 0,51 con la respiración microbiana. La materia orgánica tiene una correlación significativa con biomasa (Pearson 0,3) y respiración (Pearson 0,34), y de 0,27 con actinobacterias.



**Figura 1-** Análisis de componentes principales entre predios que previo al cultivo de soja presentaban una fase de pasturas (verde) u otro cultivo agrícola (gris). Aproximadamente un 42% de la variabilidad de las muestras se explica por el CP1 (Componente Principal 1), mientras que un 20% aproximadamente está explicado por el CP2 (Componente Principal 2).

En los análisis de componentes principales (figuras 1 y 2), se muestran el aporte de las variables (pH, Respiración Microbiana, Biomasa Microbiana, Actinobacterias, Heterótrofas y Materia Orgánica) a la formación de los ejes. Se observa que todas aumentan en el mismo sentido del componente principal 1, confirmando los resultados del análisis de las correlaciones. No se ve una diferenciación clara de los predios según el cultivo previo sea una pastura u otro cultivo agrícola (figura 1) o si practican rotación con pasturas (figura 2).



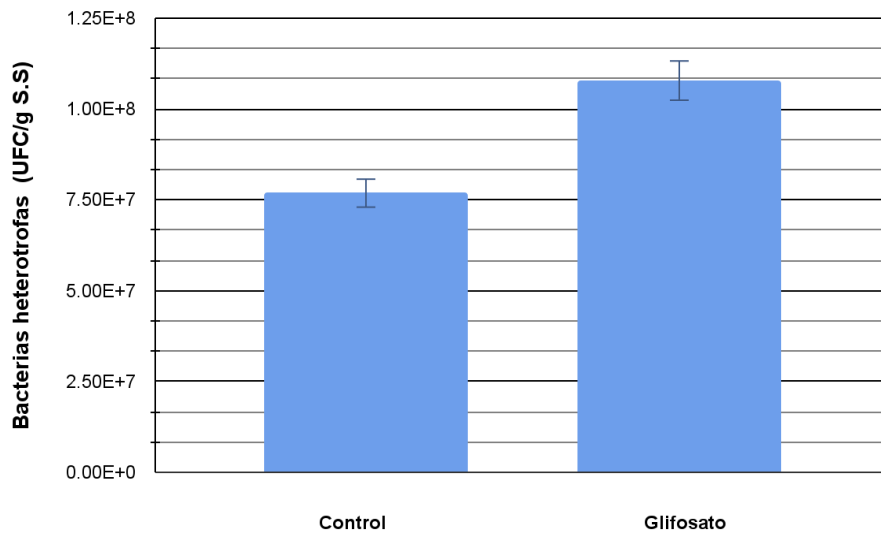
**Figura 2-** Análisis de componentes principales entre predios con rotación de pasturas (azul) o con agricultura continua sin rotación (amarillo). Aproximadamente un 42% de la variabilidad de las muestras se explica por CP1(Componente Principal 1), mientras que un 20% aproximadamente está explicado por el CP2 (Componente Principal 2).

## 5.2) Efecto del glifosato sobre la comunidad microbiana del suelo

En el ensayo de invernadero se estudió el efecto que tiene la aplicación de glifosato en el suelo no rizosférico de plantas de soja, mediante 4 indicadores microbiológicos. Los indicadores utilizados fueron abundancia de bacterias heterótrofas y actinobacterias, respiración microbiana y biomasa microbiana. Asimismo se determinó el crecimiento de las plantas, tanto de la parte aérea como radicular.

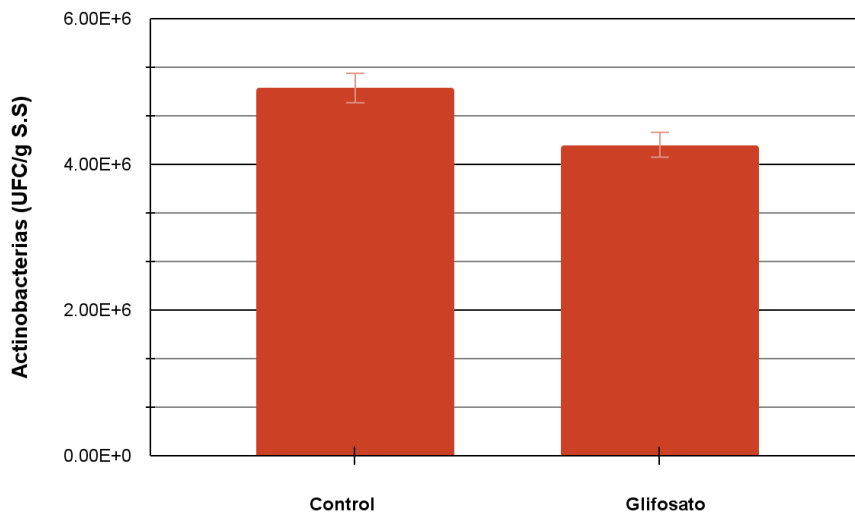
Se encontraron diferencias significativas en las medias, para 4 de las 6 variables estudiadas, entre los tratamientos control y glifosato.

La abundancia de bacterias heterótrofas, en el tratamiento control y glifosato fue de  $7.69E+07$  y  $1.08E+08$ , UFC/g S.S, respectivamente, pero el análisis estadístico descartó que la diferencia sea significativa (Figura 3).



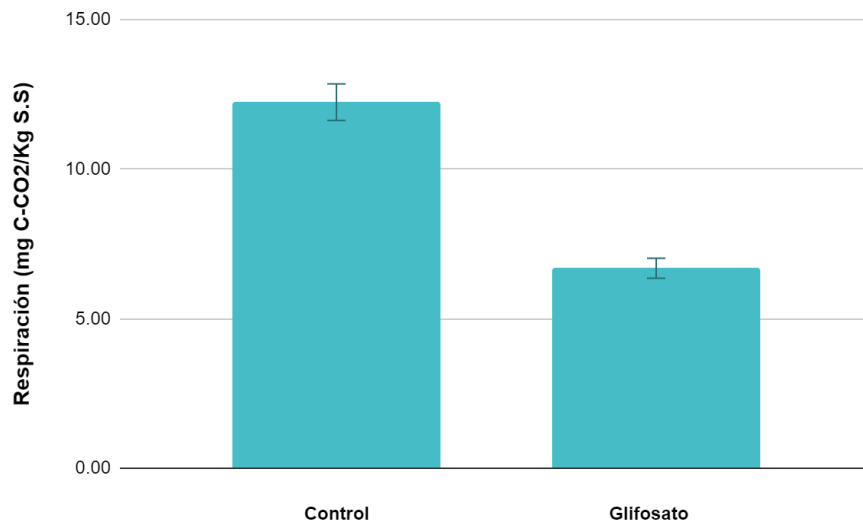
**Figura 3-** Abundancia de bacterias heterótrofas en Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo seco (UFC/g S.S) en el ensayo de invernáculo con aplicación de glifosato (n = 5). No existe diferencia significativa entre las medias de los grupos (ANOVA con p-valor > 0,05).

En el caso de la abundancia de actinobacterias, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento Control mostró una mayor abundancia (5.05E+06 UFC/g S.S) que el tratamiento con Glifosato (4.27E+06 UFC/g S.S) (Figura 4).

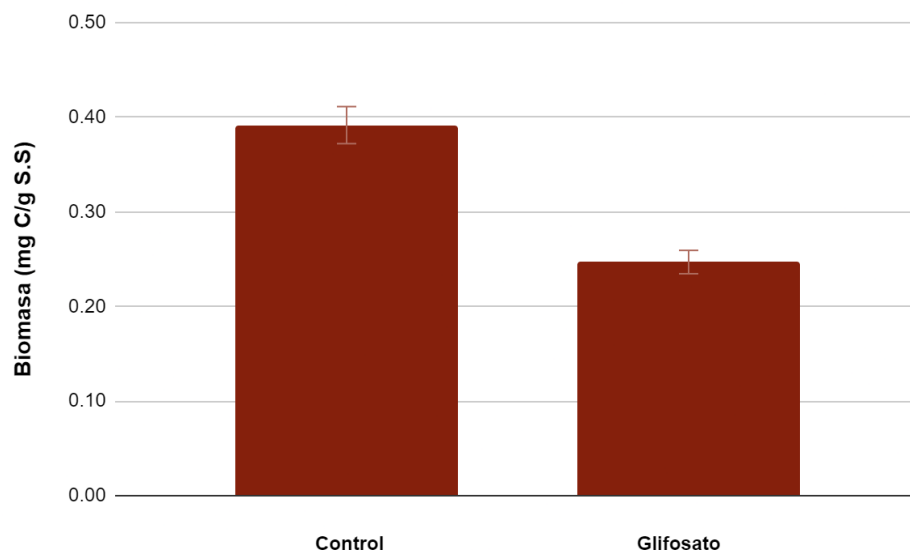


**Figura 4-** Abundancia de actinobacterias en Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo seco (UFC/g S.S) en el ensayo de invernáculo con aplicación de glifosato. Existe diferencia significativa (ANOVA con p-valor < 0,05) entre las medias de los grupos.

En la actividad microbiana se hallaron diferencias significativas, registrándose en el tratamiento control una mayor actividad (12.24 mg C-CO<sub>2</sub>/Kg S.S) que en el tratamiento con Glifosato (6.69 mg C-CO<sub>2</sub>/Kg S.S) (Figura 5). Para el carbono de la biomasa microbiana también se hallaron diferencias significativas, teniendo nuevamente un valor superior el tratamiento Control (0.39 mg C/g S.S) que el Glifosato (0.25 mg C/g S.S) (Figura 6).



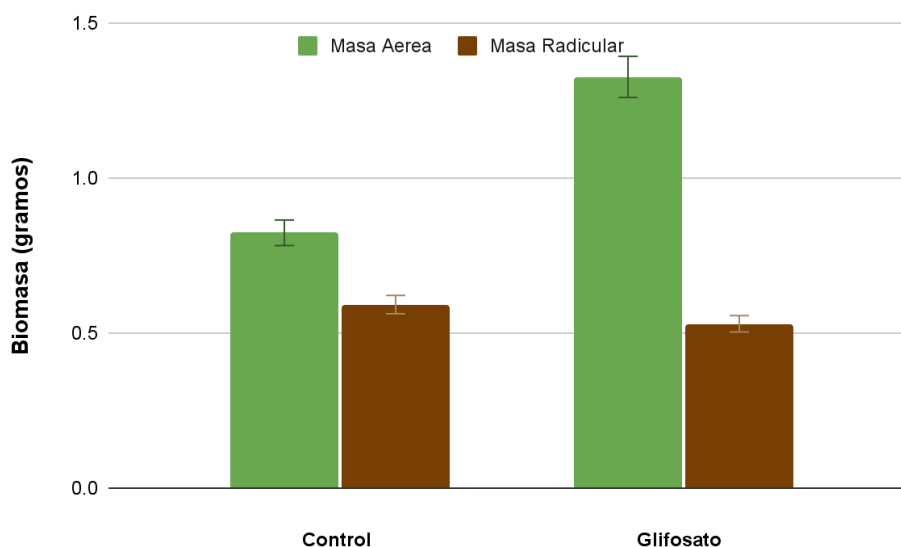
**Figura 5-** Actividad microbiana medida como respiración en miligramos de carbono respirados por kilogramo de suelo seco (mg C-CO<sub>2</sub>/Kg S.S) en el ensayo de invernáculo con aplicación de glifosato. Existe diferencia significativa (ANOVA p-valor<0,05) entre las medias de los grupos.



**Figura 6-** Carbono en la biomasa microbiana expresado en miligramos de carbono por gramo de suelo seco (mg C/g S.S) en el ensayo de invernáculo con aplicación de glifosato. Existe diferencia significativa (ANOVA p-valor<0,05) entre las medias de los grupos.



En referencia a las variables de crecimiento vegetal medidas, se encontró diferencia significativa en la masa aérea, siendo mayor en el tratamiento con Glifosato (1.32 g) que en el Control (0,82 g). Para la masa radicular no se encontraron diferencias significativas entre Control (0.59 g) y Glifosato (0.53 g) (Figura 7).



**Figura 7-** Biomasa Aérea y Radicular de plantas de soja en los tratamientos con Glifosato y Control en el ensayo de invernáculo. Existe diferencia significativa (ANOVA  $p$ -valor $<0,05$ ) entre las medias de Masa Aérea. No existe diferencia entre las medias de Masa Radicular (ANOVA  $p$ -valor $>0,05$ ).

## 6) Discusión

### 6.1) Indicadores microbiológicos en suelos de predios agrícolas

Del análisis de correlación entre indicadores, representado en la tabla 3, se desprende que existe una direccionalidad entre las variables biológicas de carácter positivo, en otras palabras, existe una redundancia en la medición de varios indicadores a la vez. Biomasa y actinobacterias son los indicadores que se correlacionan de mejor forma -exceptuando el pH- con los demás indicadores. Por tanto, y en base a nuestros resultados, ambos podrían ser una buena opción al momento de elegir qué indicadores microbiológicos usar. Un estudio determinó que la biomasa microbiana da cuenta de los cambios (correlacionados significativamente) en los microorganismos de suelo sometidos a la agricultura convencional, y por tanto, son parte de un dataset mínimo para evaluar impactos de la agricultura en el suelo (Souza et al.,2008).

En el análisis de componentes principales de los predios analizando los cultivos previos al de soja (Figura 1) se aprecia una repartición heterogénea de predios en los que antecede un cultivo agrícola, alcanzando, en algunos casos, valores extremos en ambos ejes. Esta situación puede deberse a la naturaleza del cultivo previo, ya que cultivos que sean más intensivos en el consumo de nutrientes, así como en el manejo asociado (herbicidas y fertilizantes), podrían determinar las condiciones en las que se encontrará el suelo para el cultivo de soja posterior. Por el contrario en los predios con cultivo de pasturas previo a la siembra de soja se aprecia una mayor agregación, que

los predios con otros cultivos agrícolas. Lo anterior podría deberse a que existe una mayor similitud entre el mismo tipo de cultivo previo (pasturas) respecto a la mayor diversidad de cultivos agrícolas. También existe una variabilidad en la duración de la fase de pastura durante la rotación. De esta forma todos los predios con cultivos previos de pastura, no necesariamente son suelos que se encuentran en mejores condiciones a los que ya tenían un cultivo agrícola previo a la siembra de soja, y por tanto no se correlacionan marcadamente con las variables analizadas ni se separan notoriamente del otro grupo. Un estudio realizado en Brasil en suelos con 30 años de cultivos anuales, se propuso evaluar el impacto de diferentes manejos en predios con cultivos de soja y maíz. Hallaron que el cultivo que tiene rotación con otro cultivo, ganadería y presencia de monte nativo tiene mayor cantidad de biomasa microbiana, mostrando así una diferencia marcada con el manejo convencional que presentó los valores más bajos. También existen otros seis tipos de manejos que presentaron resultados intermedios y parecidos, entre ellos, en términos de biomasa (Colman et al., 2009).

Del análisis de componentes principales representado en la Figura 2, se ve que no existe una diferenciación clara entre predios con rotación de cultivos con pasturas y sin ella. Algunos predios adoptan valores extremos en el eje CP1, por lo que los indicadores no dan cuenta de las diferencias de manejo históricas existentes. Una razón podría ser la naturaleza de los indicadores microbiológicos, que reaccionan de forma rápida al cambio en el manejo de los predios, pero que no estarían informando acerca del efecto prolongado y constante que tienen los cultivos agrícolas sobre el suelo (Martínez et al, 2018). Las diferencias individuales en cada uno de los predios a las que podría atribuirse dicha variabilidad podrían ser: el momento de muestreo, precipitaciones, otros manejos (ej. dosis de aplicación de herbicidas y fertilizantes). Por ejemplo, se ha demostrado que las poblaciones de bacterias del suelo disminuyen durante la primera semana después de la aplicación de herbicidas, en suelos tratados con atrazina, atrazina y metolacoloro, paraquat y glifosato (Sebiomo et al, 2011). Otro estudio midió el impacto en las comunidades microbianas del suelo, mediante biomasa microbiana y otros indicadores microbiológicos, de diferentes tipos de manejos -cultivares de soja y herbicidas- sobre suelos con la misma historia agrícola, durante dos años. Cuando se observaron impactos sobre las propiedades microbiológicas individuales, no se correlacionaron consistentemente con un tratamiento específico, sino que se correlacionaron con el sitio, la temporada o el cultivar de soja (Nakatani et al., 2014).

Es posible que no existan diferencias para los indicadores evaluados entre los predios, debido al momento del año en el que fueron recolectadas las muestras, finales de noviembre y todo el mes de diciembre del 2020, en donde hubo una precipitación acumulada en esos meses, para los departamentos muestreados, de 25 a 50 mm de lluvia (Portal INIA, 2022). Es reconocido el impacto que tiene la variación estacional anual sobre las comunidades microbianas del suelo. En estudios realizados en Holanda e Inglaterra se encontraron diferencias importantes en las comunidades microbianas vinculadas a la estación, humedad y temperatura del suelo (Smit et al., 2001; Orr., 2012). Por lo que idealmente, conviene estudiar los cambios en las comunidades microbianas del suelo en los meses de otoño o primavera (Bajsa, 2015).

Cabe resaltar que se llevaron a cabo análisis de correlación de Pearson, con otros indicadores físicos-químicos como %arena, %limo, %arcilla y %carbono, como también análisis de componentes principales utilizando la información de la carga de

herbicidas aplicados, pero tampoco se obtuvieron resultados concluyentes. Como ya fue comentado, los estudios de campo son relevantes, ya que permiten hacer evaluaciones en condiciones concretas reales. Por lo mismo son de carácter complejo, reducir la variabilidad espacial y temporal inherente que poseen, es fundamental para complementarlo con estudios en condiciones controladas.

## **6.2) Efecto del glifosato sobre la comunidad microbiana del suelo**

A la luz de los resultados obtenidos en el ensayo de invernadero se pueden desarrollar tres líneas reflexivas iniciales. La primera en relación a las variables microbiológicas que tuvieron diferencias significativas -biomasa, respiración y abundancia actinobacterias- y las posibles interrelaciones existentes entre estas. La segunda es la relación entre el glifosato y su efecto en la planta de soja. Por último la visión integradora entre ambas reflexiones.

Los resultados arrojaron diferencias significativas para tres -abundancia de actinobacterias, respiración y biomasa microbiana- de las cuatro variables microbiológicas medidas en el ensayo, alcanzando todas un valor superior en el tratamiento control. Podría ser que la disminución observada en la respiración microbiana, se deba a la disminución de la abundancia microbiana. Un estudio analizó la rizósfera de soja y maíz genéticamente modificados en condiciones de invernadero mediante barcoding NSG. Se halló una mayor abundancia relativa de actinobacterias en la rizósfera de ambas plantas, en los tratamientos con glifosato, que en sus respectivos controles (Newman et al., 2016). Otro estudio halló una reducción significativa de la biomasa microbiana total, a los 7 días de la aplicación de glifosato en la rizósfera de soja, pero sin cambios en la estructura de la comunidad microbiana. También se encontró que en suelos con historia de uso de glifosato, la aplicación de este, estimula la respiración microbiana, mientras que en suelos sin historia de aplicación de glifosato, la respiración microbiana se ve estimulada en un primera aplicación, para en aplicaciones sucesivas ser más baja que el control (Lane et al., 2012a, 2012b).

Otro resultado destacado, es que no se observaron diferencias en la abundancia de bacterias heterótrofas entre tratamientos, que en el caso de actinobacterias, sí vieron afectada su abundancia por el tratamiento con glifosato. En ese sentido es posible plantear que algunas bacterias del grupo de las heterótrofas tengan características degradadoras de glifosato o por lo menos algún tipo de resistencia al mismo, ya que al ser tratadas con glifosato, no presentan variación significativa en relación al tratamiento control. En el caso de las actinobacterias los resultados marcan una importante sensibilidad a dicho xenobiótico.

Para ambos grupos de microorganismos, tanto heterótrofas como actinobacterias, existe una amplia literatura científica que destaca la capacidad de degradar glifosato. Algunos ejemplos de bacterias degradadoras pueden ser *Ochrobactrum anthropi* y *Achromobacter* sp (actinobacteria)(Sviridov et al., 2012; Ermakova et al., 2017), *Comamonas odontotermitis*(Firdous et al., 2020), *Chryseobacterium* sp(Wenping et al., 2022) y *Pseudomonas* sp (Mathew et al., 2017), que pueden utilizar el glifosato como fuente de carbono/fósforo o ambos. Los estudios mencionados se encuentran en la esfera de la bioprospección y biorremediación, por lo que existe un importante sesgo hacia especies degradadoras en desmedro de especies sensibles que no son funcionales a los propósitos de las investigaciones.

Asumiendo la existencia de algún tipo de actividad degradadora, podría ser relevante evaluar el fin que se le da a la degradación del compuesto por parte de los microorganismos. Si es utilizado como fuente de carbono y energía; al disminuir su concentración, la población bacteriana cesa su crecimiento alcanzando una “meseta”. Cuando el xenobiótico no determina el crecimiento microbiano, pero es degradado a expensas de un sustrato que provea de carbono y energía, se habla de co-metabolismo. Es posible evaluar lo anterior disminuyendo la concentración del xenobiótico, y si la biomasa no se ve afectada, quiere decir que estamos en presencia de este último tipo (Zabaloy et al., 2011). En el caso de las bacterias heterótrofas no hubo aumento ni disminución de su cantidad, por lo que se podrían estar asimilando el glifosato por medio de co-metabolismo. Aunque también se podrían estar dando procesos de estimulación de una parte de la población y de inhibición de otra parte.

Otro aspecto importante es comprender las bases genéticas asociadas a las vías enzimáticas de degradación del glifosato. Es bien sabido el rol que juega la Transferencia Horizontal Genética (THG) en la evolución acelerada de las resistencias bacterianas a antibióticos y herbicidas. Dentro de ella existe un grupo heterogéneo de segmentos de ADN que tienen la capacidad de moverse dentro de una localización genética a otra en la misma célula, así como entre células distintas (que pueden o no estar vinculadas filogenéticamente), éstos reciben el nombre de Elementos Genéticos Móviles (EGMs) (Allegrini, 2017). Dentro de éstos pueden haber simples Secuencias de Inserción, como también plásmidos complejos que otorgan múltiples resistencias y complejos enzimáticos degradadores compartidos entre estos microorganismos heterótrofos.

El resultado que arrojó diferencias significativas entre la masa aérea de las plantas, de los tratamientos control y glifosato, se contrapone a la literatura científica estudiada, que demuestra reducción en la nodulación, contenido de clorofila, biomasa seca y área foliar en soja resistente al glifosato sometida a diferentes tratamientos del herbicida (Reddy et al., 2000; Zobiole et al., 2010 y 2012). No obstante, la diferencia mencionada podría deberse a la presencia de microorganismos degradadores de glifosato, que al usar la vía de la enzima C-P liasa, estarían otorgando una mayor disponibilidad de Pi a la planta y estimulando su crecimiento. Hay un estudio que propone que a muy bajas dosis de glifosato, se estimula el crecimiento de plantaciones sensibles a glifosato, en un proceso que recibe el nombre de hormesis (Meseldžija et al., 2020).

Una observación que no fué medida en esta tesis, pero que genera una serie perspectivas futuras para analizar, es la diferencia morfológica de las raíces entre los tratamientos Control y Glifosato. El último mostró raíces más gruesas y cortas, mientras que en el tratamiento Control raíces finas y alargadas (Anexo, Figura 10). Como en el ensayo no se aplicó ningún tipo de fertilizante, la obtención de nutrientes esenciales por parte de las raíces de la soja, podría haber dirigido la diferencia en la arquitectura de las raíces en las plantas. En estudios futuros se podría evaluar el efecto del glifosato en la arquitectura radicular, en presencia y ausencia de nutrientes esenciales. Un estudio propone al fósforo como principal impulsor del crecimiento direccional en raíces de plantas en soja genéticamente modificada, destacándolo como mineral primordial para el desarrollo celular, pero a su vez, sumamente escaso en el suelo y por tanto limitante (Mahanta et al., 2014). Razón por la que éste nutriente podría ser candidato a ser evaluado, más aún sabiendo que una de las vías de degradación del glifosato tiene como uno de sus productos Pi.

En el mismo orden de importancia está la estimulación de la rizósfera mediante la secreción de metabolitos y otros compuestos, suministrados en gran parte, por las mismas raíces, que propician un ambiente favorable de bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Estos microorganismos podrían ser otros indicadores relevantes a evaluar, como solubilizadores de fósforo, producción de sideróforos, bacterias nitrificantes, (Chen et al., 2017; Kuzmicheva et al., 2017; Vives-Peris et al., 2020; Balakrishna et al., 2012) que puedan explicar las diferencias observadas en las plantas.

Las inferencias anteriores se enmarcan en el campo de estudio que evalúa la afectación del glifosato en la absorción de varios compuestos minerales, en cultivos resistentes al mismo. En este campo convergen resultados contradictorios entre los diferentes estudios. En un trabajo donde evaluó el estatus nutricional de macro/micronutrientes, así como actividades metabólicas vinculadas a la fotosíntesis y respiración celular, de soja resistente al glifosato, no se encontraron efectos significativos en el crecimiento, producción y nutrición mineral de la planta. Otros autores proponen una baja eficiencia en la captación y aprovechamiento de los nutrientes en el caso de la soja Genéticamente Modificada (Costa et al., 2018; Duke et al., 2012).

Otras líneas de investigación plantean inconsistencias en la literatura científica, ya que refutan los efectos adversos del uso del glifosato y especies genéticamente modificadas. En éstas se resalta la no comprobación de que el glifosato sea el causante de enfermedades comunes, como el amarillamiento de los cultivos de soja, así como sus defectos en la obtención de minerales como Manganeseo (Mn) y Hierro (Fe), debidos al uso de glifosato (Duke, 2018; Velini et al., 2008).

## **7) Conclusiones**

Los resultados obtenidos en esta tesis en condiciones controladas, permitieron evaluar mediante indicadores microbiológicos, los cambios en la comunidad microbiana del suelo en cultivos de soja sometidos a aplicaciones de glifosato. Se logró evidenciar una disminución en la respiración, biomasa y actinobacterias, pero sin observarse efectos sobre abundancia de bacterias heterótrofas. De esta forma se determinó el efecto de la aplicación de glifosato sobre ciertos parámetros de la comunidad microbiana en el suelo no rizosférico.

Este estudio también deja planteadas preguntas que podrán ser analizadas en estudios posteriores, sobre cómo influye el glifosato en los microorganismos rizosféricos, y en la arquitectura de las raíces. Los análisis realizados se podrían complementar con herramientas de secuenciación masiva (NGS), que permitan describir la estructura y diversidad de la comunidad microbiana y poner foco en el estudio de los genes de degradación de glifosato. De esa forma saber qué podría estar detrás de la degradación de glifosato, y así tener una idea mucho más acabada de las vías metabólicas usadas.

Según nuestros resultados las variables microbianas medidas no resultaron ser buenos indicadores para diferenciar la intensidad de uso de suelo en los sistemas agrícolas estudiados. Una importante debilidad de los análisis realizados en nuestro estudio, es que no hay comparación con muestras testigo de los predios, para saber cómo se encuentran los predios en relación a sí mismos. De esta forma normalizar la evolución de los predios y posibilitar una comparación más exacta entre predios de tan

diversas características. La variabilidad y complejidad inherente a los estudios de campo, puede ser reducida, estandarizando y comparando similares manejos de los campos, además de muestrear en una forma continua -todos los años- y preferiblemente en los meses de primavera u otoño, que poseen las condiciones propicias de humedad y temperatura para el análisis de microorganismos.

Igualmente y a pesar de las múltiples limitaciones del trabajo realizado, no hay que perder de vista el contexto global y la motivación que avalan este tipo de investigaciones. Luego de un poco más de 20 años desde el inicio del cambio acelerado en el uso de los suelos, las problemáticas surgidas a partir de este cambio ocupan la agenda pública. Se entendió que el suelo, la gran riqueza del país, es un recurso no renovable y por tanto finito, la agricultura convencional por medio de monocultivos transgénicos degrada este recurso, y eso trae consecuencias para el futuro del país. Es por eso que este trabajo representa un modesto aporte a la medición del efecto de la intensificación agrícola en las comunidades microbianas de los suelos, que es fundamental en el presente y futuro del Uruguay.

## 8) Bibliografía

- Achkar, M., Domínguez, A., & Pesce, F. (2006). Principales Transformaciones Territoriales en el Uruguay Rural Contemporáneo. *PAMPA*, (2), 219–242. <https://doi.org/10.14409/pampa.v1i2.3137>
- Adelowo, F.E.; Olu-Arotiowa, O.A. and Amuda, O. S. (2014). Biodegradation of Glyphosate by Fungi Species Phosphorus ( C-P ) bond. *Advances in Bioscience and Bioengineering*, 2(1), 104–118.
- Allegrini, M. (2017). Análisis del impacto de glifosato sobre comunidades microbianas de suelos de la región pampeana mediante un enfoque fisiológico y molecular. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Rosario (Argentina).
- Anderson J.P.E. 1985. Soil respiration. En: A.L. Page (ed) *Methods of soil analysis*, part 2, 2nd edn. Soil Science society of America, Madison, Wis. Pp 837-87.
- Arbeletche, P., & Gutiérrez, G. (2010). Crecimiento de la Agricultura en Uruguay: Exclusión Social o Integración Económica en Redes. *Pampa*, 6, 113–138. <https://doi.org/10.14409/pampa.v1i6.3179>
- Bajsa, N. (2015). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en suelos con rotación de cultivos. Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.
- Battistuzzi, F. U., & Hedges, S. B. (2009). A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land. *Molecular Biology and Evolution*, 26(2), 335–343. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn247>
- Balakrishna, G., Shanker Shiva, A., Kumar Pindi, P. (2012). Isolation of Phosphate Solubilizing Actinomycetes from Forest Soils of Mahabubnagar District. *IOSR Journal of Pharmacy*, Vol. 2(2) pp: 271-275.
- Bozzo, A. (2010.). Persistencia del glifosato y efecto de sucesivas aplicaciones en el cultivo de soja en agricultura continua en siembra directa sobre parámetros [biológicos] del suelo. Tesis de maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.
- Cardoso, E. J. B. N., Vasconcellos, R. L. F., Bini, D., Miyauchi, M. Y. H., dos Santos, C. A., Alves, P. R. L., de Paula, A. M., Nakatani, A. S., Pereira, J. de M., & Nogueira, M. A. (2013). Soil health: Looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health? *Scientia Agricola*, 70(4), 274–289. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000400009>
- Conde, A. (2011.). Efecto del glifosato sobre comunidades microbianas benéficas y patógenas del suelo en Uruguay. Tesis de maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.
- Chen, Y. T., Wang, Y., & Yeh, K. C. (2017). Role of root exudates in metal acquisition and tolerance. *Current Opinion in Plant Biology*, 39(lii), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.06.004>
- Colman, B. A., Salton, J. C., Mercante., F. M. (2009). Indicadores microbiológicos para avaliação da qualidade do solo em diferentes sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária(Embrapa).

- Costa, F. R., Rech, R., Duke, S. O., & Carvalho, L. B. (2018). Lack of effects of glyphosate and glufosinate on growth, mineral content, and yield of glyphosate- and glufosinate-resistant maize. *GM Crops and Food*, 9(4), 189–198. <https://doi.org/10.1080/21645698.2018.1511204>
- Doran, J.W. y T.B. Parkin. 1996. Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. In J.W. Doran and A.J. Jones, eds. *Methods for Assessing Soil Quality*. SSSA, Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Doran, J.W., Stamatiadis, S. & Haberern, J. 2002. Soil health as an indicator of sustainable management. Publications from USDA-ARS / UNL Faculty. (also available at <https://digitalcommons.unl.edu/usdaarsfacpub/180>).
- Duke, S. O., Lydon, J., Koskinen, W. C., Moorman, T. B., Chaney, R. L., & Hammerschmidt, R. (2012). Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosate-resistant crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(42), 10375–10397. <https://doi.org/10.1021/jf302436u>
- Ermakova, I. T., Shushkova, T. V., Sviridov, A. V., Zelenkova, N. F., Vinokurova, N. G., Baskunov, B. P., & Leontievsky, A. A. (2017). Organophosphonates utilization by soil strains of *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp. *Archives of Microbiology*, 199(5), 665–675. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1343-8>
- FAO. (2021). *Propiedades Químicas | Portal de Suelos de la FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. <http://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/clasificacion-de-suelos/sistemas-numericos/propiedades-quimicas/es/>
- Ferraris, Gustavo & Ant, G. & Díaz-Zorita, Martín. (2006). Aportes actuales y futuros de tratamientos biológicos sobre la nutrición nitrogenada y producción de soja en el Cono Sur. *Universidad de Buenos Aires*.
- Firdous, S., Iqbal, S., & Anwar, S. (2020). Optimization and modeling of glyphosate biodegradation by a novel *Comamonas odontotermitis* P2 through response surface methodology. *Pedosphere*, 30(5), 618–627. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60381-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60381-3)
- Froni, L. (2006). Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 418-419.
- Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M. L., Fischer, M., & Schönbrunn, E. (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), 13010–13015. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603638103>
- Galeano, P. (2017). Los cultivos transgénicos en Uruguay y el mundo. En: 20 años de cultivos transgénicos en Uruguay. REDES Amigos de la Tierra. 5-34.
- Hoffman, E. (2013). Criterios y estrategias de fertilización que apunten a asegurar el suministro de fósforo en cultivos de soja de segunda. *Informaciones Agronómica de Hispanoamérica*, 11, 2–7.
- Hove-Jensen, B., Zechel, D. L., & Jochimsen, B. (2014). Utilization of Glyphosate as Phosphate Source: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(1), 176–197. <https://doi.org/10.1128/mubr.00040-13>
- Hymowitz, T., Newell, C. A. (1981). Taxonomy of the genus glycine, domestication and uses of soybeans. *Economic Botany*, 35(August 1980), 272–288.



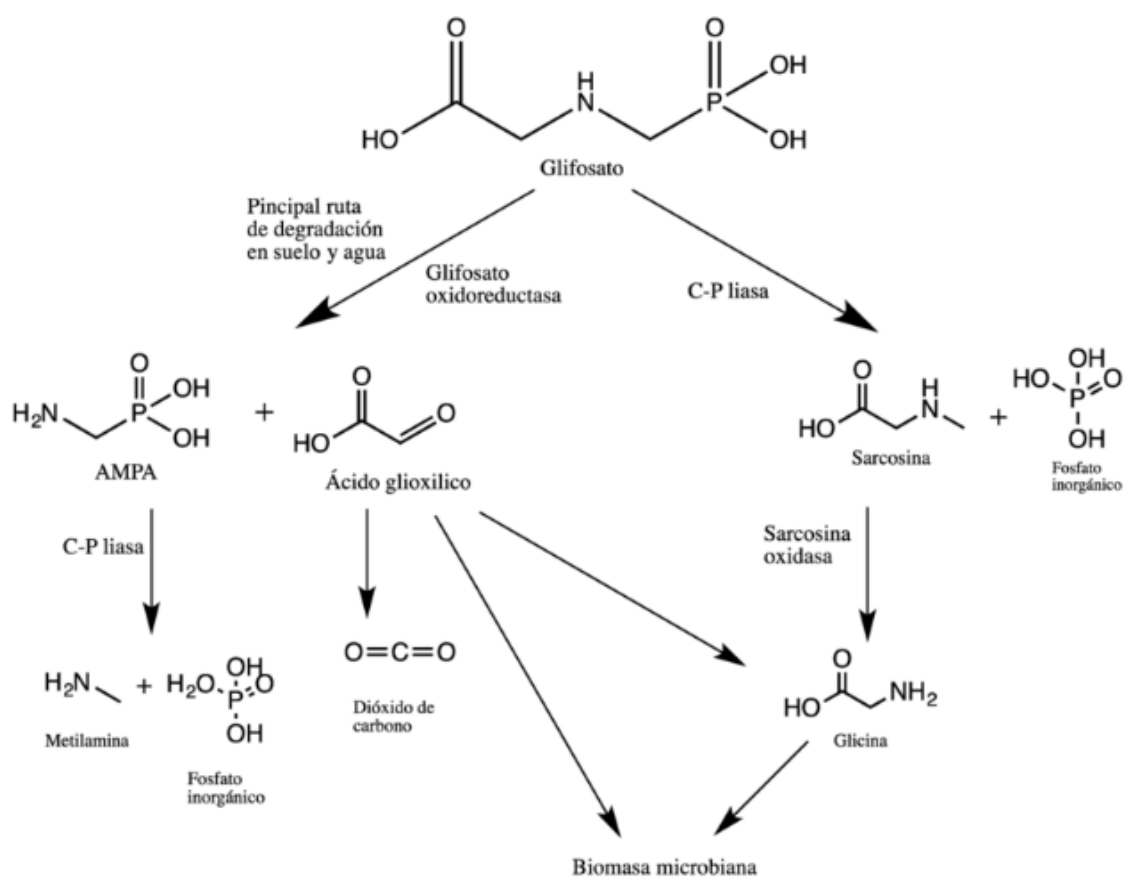
- Järvan, M., Edesi, L., Adamson, A., & Võsa, T. (2014). Soil microbial communities and dehydrogenase activity depending on farming systems. *Plant, Soil and Environment*, 60(10), 459–463. <https://doi.org/10.17221/410/2014-pse>
- Kandeler E., Eder G., y Sobotik M. (1994).Kandeler, E., Eder, G. & Sobotik, M. Microbial biomass, N mineralization, and the activities of various enzymes in relation to nitrate leaching and root distribution in a slurry-amended grassland. *Biol Fertil Soils* 18, 7–12. <https://doi.org/10.1007/BF00336437>
- 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. In *Microbiological Research*,169(1), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.03.002>
- Khan, A., Jilani, G., Saleem Akhtar, M., Jilani, G., Akhtar, M. S., S Naqvi, S. M., & Rasheed, M. (2009). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *J. Agric. Biol. Sci.*, 1, 48–58.
- Kuzmicheva, Y. V., Shaposhnikov, A. I., Petrova, S. N., Makarova, N. M., Tychinskaya, I. L., Puhalsky, J. V., Parahin, N. V., Tikhonovich, I. A., & Belimov, A. A. (2017). Variety specific relationships between effects of rhizobacteria on root exudation, growth and nutrient uptake of soybean. *Plant and Soil*, 419(1–2), 83–96. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3320-z>
- Lane, M., Lorenz, N., Saxena, J., Ramsier, C., & Dick, R. P. (2012). Microbial activity, community structure and potassium dynamics in rhizosphere soil of soybean plants treated with glyphosate. *Pedobiologia*, 55(3), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2011.12.005>
- 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(6), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2012.08.001>
- Leoni, C. y Ghini, R. (2003). Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade in vitro a *Phytophthora nicotianae*. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 67-75.
- Mahanta, D., Rai, R. K., Mishra, S. D., Raja, A., Purakayastha, T. J., & Varghese, E. (2014). Influence of phosphorus and biofertilizers on soybean and wheat root growth and properties. *Field Crops Research*, 166, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2014.06.016>
- Martínez, L. E., Vallone, R. C., & Pino, M. M. (2018). Variación temporal de indicadores microbiológicos y químicos de suelo árido regadío incubado con abonos orgánicos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 44(2), 39–47.
- Mathew, Jiby & K C, Anjana & N K, Sajeshkumar & Vazhacharickal. (2017). Isolation and molecular characterization of Glyphosate resistant bacteria from agricultural soils in Kerala.
- Meseldžija, M., Lazić, S., Dudić, M., Šunjka, D., Rajković, M., Marković, T., Vukotić, J., et al. (2020). Is There a Possibility to Involve the Hormesis Effect on the Soybean with Glyphosate Sub-Lethal Amounts Used to Control Weed Species *Amaranthus retroflexus* L.? *Agronomy*, 10(6), 850. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy10060850>
- Nakatani, A. S., Fernandes, M. F., De Souza, R. A., Da Silva, A. P., Dos Reis-Junior, F. B., Mendes, I. C., & Hungria, M. (2014). Effects of the glyphosate-resistance gene

- and of herbicides applied to the soybean crop on soil microbial biomass and enzymes. *Field Crops Research*, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2014.03.010>
- Newman, M. M., Hoilett, N., Lorenz, N., Dick, R. P., Liles, M. R., Ramsier, C., & Kloepper, J. W. (2016). Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. *Science of the Total Environment*, 543, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.008>
- Orr, C. H., Leifert, C., Cummings, S. P., & Cooper, J. M. (2012). Impacts of Organic and Conventional Crop Management on Diversity and Activity of Free-Living Nitrogen Fixing Bacteria and Total Bacteria Are Subsidiary to Temporal Effects. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052891>
- Duke, S. O., & Powles, S. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 63(11), 1100–1106. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Parada, R. B., Marguet, E. R., & Vallejo, M. (2017). Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 17–23. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.64098>
- Portal INIA Mapas de precipitación acumulada. (n.d.). Consultada Agosto 10, 2022, from <http://www.inia.uy/gras/Clima/Precipitación-nacional/Mapas-de-precipitación-acumulada/>
- Presidencia de la República. (2016). *Siembra Directa. Su aplicación en el área de cultivos de secano* | Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Retrieved Agosto 24, 2021, from <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/estadisticas/siembra-directa-su-aplicacion-area-cultivos-secano>
- Presidencia de la República. (2019). *China es el principal destino de la soja uruguaya, con casi 1,4 millones de toneladas adquiridas en la última zafra*. <https://www.gub.uy/presidencia/comunicacion/noticias/china-es-principal-destino-soja-uruguay-casi-14-millones-toneladas#:~:text=República Oriental del Uruguay&text=La exportación de soja de,%2C6 %25 del total exportado>
- Reddy, K. N., Hoagland, R. E., & Zablutowicz, R. M. (2000). Effect of glyphosate on growth, chlorophyll, and nodulation in glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) varieties. *Journal of New Seeds*, 2(3), 37–52. [https://doi.org/10.1300/J153v02n03\\_03](https://doi.org/10.1300/J153v02n03_03)
- Reynoso, E., Peña Moreno, R., Torres, E., Tenorio Arvide, M. G., Morales-Lara, L., Reyes-López, D., Mauricio, A. (2020). Evaluación Espacio-Temporal del Herbicida Glifosato en Aguas de la Localidad de Tenampulco, Puebla para la Modelación de la Exposición Humana. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.11863.50084>
- Salvagiotti, F., Capurro, J., & Enrico, J. (2009). El manejo de la nutrición nitrogenada en soja. *Inta*, 42, 45–51.
- Sebiomo A, Ogundero VW, Bankole SA. (2011). Effect of four herbicides on microbial population, organic matter and dehydrogenase activity. *African Journal of Biotechnology* 10: 770–778.
- Senatore, D. (2013). Vinaza como fertilizante de caña azucarera : efecto sobre la comunidad bacteriana del suelo. Tesis de maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.

- Sicardi, M., Garcia-Prechac, F., Frioni, L. (2004). Soil microbial indicators sensitive to land use conversion from pastures to commercial *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) plantations in Uruguay. *Applied Soil Ecology* 27: 125-133.
- Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., Van Den Broek, J., Van Mil, S., & Wernars, K. (2001). Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in a Wheat Field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2284–2291. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2284-2291.2001>
- Souza, R.A., Hungria, M., Franchini, J.C., Maciel, C.D., Campo, R.J., Zaia, D., (2008). Minimal set of parameters for evaluation soil microbiota and biological nitrogen fixation in soybean. *Pesq. Agropec. Bras.* 43, 83–91.
- Stevens, A. W. (2018). Review: The economics of soil health. *Food Policy*, 80(August), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2018.08.005>
- 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.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(2), 787–796. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3485-y>
- Vance, E. D., Brookes, P. C., & Jenkinson, D. S. (1987). Microbial biomass measurements in forest soils: Determination of kC values and tests of hypotheses to explain the failure of the chloroform fumigation-incubation method in acid soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(6), 689–696. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90050-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90050-2)
- Velini, E., Alves, E., Godoy, M., Meschede, D., Souza, R., & Stephen, D. (2008). Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. *Pest Management Science*, 63(11), 1100–1106. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2020). Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports*, 39(1), 3–17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>
- Wenping, Z., Jiayi, L., Yuming, Z., Xiaozhen, W., Zhe, Z., Yaohua, H., Yingjie, Z., Sandhya, M., Pankaj, B., & Shaohua, C. (2022). Characterization of a novel glyphosate-degrading bacterial species, *Chryseobacterium* sp. Y16C, and evaluation of its effects on microbial communities in glyphosate-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 432. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128689>
- Zabaloy, M. C. , Zanini, G. P. , Bianchinotti, V., Gomez, M. A. , & Garland, J. L. (2011). Herbicides in the Soil Environment: Linkage between Bioavailability and Microbial Ecology. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/12880>
- Zobiolo, L. H. S., de Oliveira, R. S., Huber, D. M., Constantin, J., de Castro, C., de Oliveira, F. A., & de Oliveira, A. (2010). Glyphosate reduces shoot concentrations of mineral nutrients in glyphosate-resistant soybeans. *Plant and Soil*, 328(1), 57–69. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0081-3>
- Zobiolo, L. henrique saes, Kremer, R. john, de Oliveira, R. silvério, & Constantin, J. (2012). Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175(2), 319–330. <https://doi.org/10.1002/jpln.201000434>



## 9) Anexo



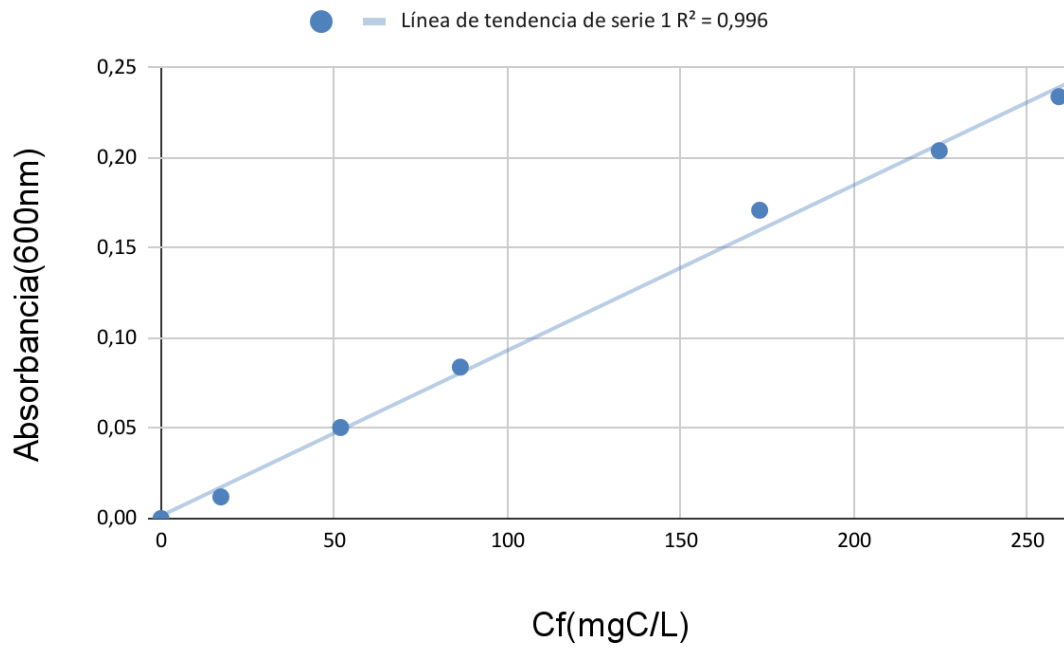
**Figura 8-** Esquema con las posibles vías de degradación del glifosato; con las enzimas que participan en cada paso, sus productos intermedios y finales. Imagen obtenida de Reynoso et al.,2020.



**Figura 9-** Mapa del Uruguay con líneas divisorias entre departamentos. Se señalan los tres departamentos Colonia, Soriano y Paysandú que contienen los predios muestreados con la señalética color rojo.



**Figura 10-** Plantas de soja variedad Tec Irga 6070 RR (Fadisol) tolerante al herbicida glifosato, en estadio fenológico V3. Agrupadas al lado derecho de la figura, se encuentran las plantas con el tratamiento de Glifosato, y del lado izquierdo las plantas con el tratamiento Control.



**Figura 11-** Curva de calibración para interpolación de datos de las muestras en la determinación de biomasa. La concentración final (Cf) se expresa en miligramos de Carbono por litro (mgC/L). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 600 nm y la fiabilidad de la línea de tendencia se expresa como  $R^2$ .



**Tabla 4-** Valores obtenidos de los análisis realizados en las muestras de cada uno de los predios, como también la media, valor máximo y mínimo de todos los predios. Se expresan: La abundancia de bacterias heterótrofas en Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo seco (UFC/g S.S); La abundancia de actinobacterias en Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo seco (UFC/g S.S); La actividad microbiana medida como respiración en miligramos de carbono respirados por kilogramo de suelo seco (mg C-CO<sub>2</sub>/Kg S.S); El carbono en la biomasa microbiana expresado en miligramos de carbono por gramo de suelo seco(mg C/g S.S); El pH en unidades de pH y el porcentaje de materia orgánica (%MO) en relación al total del suelo. Cultivo previo a la plantación de soja, pudiendo ser pasturas(C/past) u otro cultivo agrícola(C/agric). Predios que realizan(SI) o no (NO) una rotación con pasturas.

Predio	Biomasa(mg C/g S.S)	Hetero (UFC/g S.S)	Actino (UFC/g S.S)	Respiración (mg C-CO <sub>2</sub> /Kg S.S)	pH	%MO	Cultivo previo	Rotación Pasturas
1	0,39022	3,55E+07	1,54E+07	6,3195	5,37	4,8144	C/past	SI
2	ND	2,53E+08	1,44E+07	7,2845	5,55	4,261	C/past	SI
3	0,42649	1,51E+08	1,48E+07	6,0377	4,98	6,0319	C/agric	SI
4	0,72366	2,24E+08	1,77E+07	20,2892	7	6,9173	C/agric	SI
5	0,23869	6,62E+07	9,04E+06	5,652	4,84	6,3639	C/agric	SI
6	0,65471	9,18E+07	1,68E+07	5,8856	5,02	7,194	C/agric	SI
7	0,53611	9,91E+07	7,43E+06	7,1465	4,5	6,2532	C/agric	NO
8	0,4487	3,38E+08	1,71E+07	6,1838	5,23	5,2571	C/agric	NO
9	0,39022	1,74E+08	1,51E+07	8,2154	5,83	4,1376	C/agric	NO
10	0,46529	8,44E+07	1,21E+07	5,6685	4,8	5,5892	C/agric	NO
11	0,59607	3,78E+07	8,95E+06	6,7339	5,73	7,3047	C/agric	NO
12	ND	5,21E+07	1,09E+07	7,7875	4,97	8,9648	C/agric	NO
13	0,35177	1,10E+08	9,16E+06	4,9553	4,92	6,6959	C/agric	NO
14	0,22056	4,71E+07	9,07E+06	7,7993	4,98	5,8105	C/agric	SI
15	0,49646	8,59E+07	1,53E+07	8,9478	4,8	5,6998	C/agric	SI
16	0,61517	3,38E+08	1,38E+07	7,218	4,9	6,0872	C/agric	SI
17	0,29571	6,98E+07	7,56E+06	3,974	4,79	4,0397	C/past	SI
18	0,08837	1,37E+08	6,34E+06	6,1104	4,71	5,1465	C/past	SI
19	0,37425	3,69E+07	6,89E+06	7,6192	4,37	5,5531	C/past	SI
20	0,40099	7,24E+07	5,07E+06	5,9262	4,42	6,6959	C/past	SI

21	0,4592	1,00E+08	7,01E+06	4,9226	4,82	5,2018	C/past	SI
22	0,39229	1,55E+08	1,23E+07	7,3831	5,35	5,4785	C/past	SI
23	0,33691	1,21E+08	1,11E+07	8,2651	5,35	5,4785	C/agric	SI
24	0,37995	1,07E+08	6,15E+06	1,2639	4,37	5,4232	C/agric	SI
25	0,38029	9,38E+07	1,11E+07	7,2619	5	4,9542	C/past	SI
26	0,32856	6,94E+07	6,47E+06	9,3836	4,92	5,9212	C/past	SI
27	0,41471	1,10E+08	1,24E+07	6,8142	5,05	5,4232	C/past	SI
28	0,46602	1,41E+08	8,79E+06	9,5156	5,72	4,4098	C/past	SI
29	0,44711	1,02E+08	8,14E+06	5,5575	5,28	3,9844	C/agric	SI
30	0,25669	4,58E+07	8,71E+06	5,9945	4,96	4,5377	C/agric	SI
31	0,18989	1,49E+07	7,09E+06	ND	4,58	3,6523	C/agric	NO
32	0,22832	8,36E+07	5,02E+06	8,8043	5,23	6,3639	C/agric	NO
33	0,13047	2,26E+07	9,02E+06	5,6211	4,7	6,3086	C/agric	NO
34	0,24463	2,00E+07	5,90E+05	1,2594	5,2	3,7565	C/agric	NO
35	0,27146	ND	4,10E+06	5,147	4,76	5,0358	C/agric	NO
36	0,1957	6,28E+07	6,66E+06	2,8176	4,84	4,2057	C/agric	NO
37	0,20987	4,68E+07	8,19E+06	4,1221	4,63	4,3164	C/agric	NO
38	0,33194	1,72E+08	7,14E+06	2,1044	5,23	5,5338	C/agric	NO
39	0,10366	3,93E+07	8,26E+06	0,5599	5,05	4,8698	C/agric	NO
40	0,31802	4,90E+07	9,80E+06	6,675	5,15	4,5931	C/agric	NO
41	ND	4,68E+07	3,74E+06	4,8716	5,05	4,7591	C/agric	NO
42	0,22017	9,09E+07	9,43E+06	0,4855	4,86	5,0911	C/agric	SI
43	0,27725	9,50E+07	9,03E+06	5,0736	6,52	5,7552	C/agric	SI
44	0,16309	ND	ND	2,3678	5,33	4,8453	C/agric	SI
45	0,17124	1,23E+08	2,21E+06	5,4971	4,25	3,9198	C/agric	NO
46	0,26094	6,76E+07	2,93E+06	5,773	4,06	3,597	C/agric	NO
47	0,29355	1,02E+08	8,55E+06	7,3561	4,72	7,028	C/agric	NO
48	0,23647	3,58E+07	3,58E+06	6,1174	4,37	4,8698	C/agric	NO
49	0,26298	3,30E+07	1,16E+07	5,164	4,95	6,2532	C/agric	NO
50	0,39766	4,91E+07	1,20E+07	7,3384	5,6	6,8619	C/agric	NO

<b>51</b>	0,44258	4,94E+07	9,88E+06	5,8015	4,61	6,9173	C/agric	NO
<b>52</b>	0,35419	3,56E+07	1,08E+07	6,3345	4,81	5,5892	C/agric	NO
<b>53</b>	0,24463	4,38E+07	1,17E+07	9,8225	4,8	3,7565	C/past	SI
<b>54</b>	0,17939	7,17E+07	6,21E+06	0,3828	4,49	4,5931	C/past	SI
<b>55</b>	0,26909	1,43E+08	9,86E+06	3,4247	4,73	4,8144	C/past	SI
<b>56</b>	0,21201	2,85E+08	1,70E+07	4,1857	4,86	5,6998	C/past	SI
<b>57</b>	0,32617	1,08E+08	9,99E+06	11,3097	7,52	5,8659	C/agric	NO
<b>58</b>	0,24463	4,56E+07	8,44E+06	7,7938	5,66	4,2057	C/agric	NO
<b>59</b>	0,32617	4,85E+07	1,80E+07	6,7398	6,83	5,662	C/past	SI
<b>60</b>	0,30171	8,24E+07	8,13E+06	5,7866	5,2	5,4785	C/past	SI
<b>61</b>	0,34248	5,82E+07	8,61E+06	14,5467	5,32	7,3047	C/agric	NO
<b>62</b>	0,23647	1,26E+08	1,61E+07	25,3902	7,13	5,8105	C/agric	NO
<b>63</b>	0,26909	9,99E+07	3,62E+06	8,5333	7,25	5,9765	C/agric	NO
<b>64</b>	0,16309	4,70E+07	5,76E+06	4,267	6,82	5,2571	C/agric	NO
<b>65</b>	ND	ND	ND	ND	5,39	4,9804	C/agric	NO
<b>66</b>	0,33433	4,85E+07	5,58E+06	11,4058	7,19	6,9726	C/agric	NO
<b>67</b>	0,29355	3,53E+07	8,36E+06	5,535	5,78	6,0319	C/past	SI
<b>68</b>	0,30171	8,25E+07	5,54E+06	5,5415	5,7	5,6998	C/past	SI
<b>69</b>	0,25278	1,66E+07	5,32E+06	5,204	5,29	3,3203	C/past	SI
<b>70</b>	0,24188	1,15E+07	8,17E+06	6,8824	5,7	4,3164	C/past	SI
<b>Media</b>	0,30008	7,20E+07	8,25E+06	5,4739	5,1894	5,3149		
<b>Valor máximo</b>	0,72366	3,38E+08	1,80E+07	25,3902	7,52	8,9648		
<b>Valor mínimo</b>	0,08837	1,15E+07	5,90E+05	0,3828	4,06	3,3203		