

TESIS

Presentada por

MARIA ALEXANDRA BOZZO DE BRUM

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAGISTER EN CIENCIAS AMBIENTALES

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES
MONTEVIDEO, URUGUAY**

**PERSISTENCIA DEL GLIFOSATO Y EFECTO
DE SUCESIVAS APLICACIONES EN EL
CULTIVO DE SOJA EN AGRICULTURA
CONTINUA EN SIEMBRA DIRECTA SOBRE
PARAMETROS BIOLOGICOS DEL SUELO**

Tesis defendida el 8 de setiembre de 2010

Orientadores:

Dra Gabriela Eguren
Dra Lillían Frioni

Tribunal:

Dra Alice Altesor
MSc Alcía Arias
Ing. Agr. Oswaldo Ernst

AGRADECIMIENTOS.

Al terminar esta etapa de mi vida quisiera agradecer de todo corazón a:

Dios †: Por darme la fuerza, la paciencia y la voluntad para seguir adelante y superar todos los obstáculos y momentos difíciles que se fueron presentando en el camino y por acompañarme SIEMPRE.

- A mis padres: Porque al finalizar esta etapa de mi vida, todos los sacrificios, penas y alegrías que compartieron conmigo, hoy dieron su recompensa. “Gracias”.

-Al compañero de mi vida, Alfredo: por el permanente e incondicional apoyo y comprensión que siempre me brindó, sobretodo en los momentos más difíciles de la Maestría.

- A mis queridos hijos: Agustín, Gonzalo, Catalina, Matilde y María Victoria por su paciencia, alegría y cariño brindados, esenciales para poder superar las dificultades presentadas durante todos estos años.

- A mi suegra y a mi cuñada Magdalena, por su constante e incondicional ayuda.

- A mis 5 hermanos y en particular a mi hermana Patricia y a su marido por su enorme solidaridad y los gratos momentos compartidos.

- A mis orientadores Dra. Gabriela Eguren y Dra Lillián Frioni por sus valiosas sugerencias y su constante disposición.

- A los integrantes del tribunal, Dra Alice Altesor y MSc Alicia Arias y al Ing. Agr. Oswaldo Ernst por sus opiniones brindadas para mejorar el presente trabajo.

- Al Ing. Agr. Oswaldo Ernst por sus sugerencias técnicas y por facilitarme realizar este trabajo en los ensayos instalados en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (Paysandú).

- A la Dra. Monica Cadenazzi por su valiosa colaboración y asesoramiento en el procesamiento estadístico de los datos, por su amistad y por su incondicionalidad.

- A la Confederación Uruguaya de Entidades Cooperativas (CUDECOOP), Proyecto de Producción Responsable (PPR)- MGAP, Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Comisión Coordinadora del Interior (CCI) y a la Comisión Académica de Posgrado (CAP) por el apoyo económico brindado para la financiación de los análisis microbiológicos y las determinaciones de glifosato y AMPA en suelo.
- A la Lic. MSc. Lucía Sanjurjo, compañera de la Cátedra de Microbiología, por su invalorable colaboración en la realización de los análisis de laboratorio y por su calidad humana.
- A la Ing. Agr. Celmira Saravia por sus valiosos aportes técnicos.
- Al funcionario de la Regional Norte: Omar Sena por su disposición, paciencia y colaboración en el tratamiento de las muestras de suelo.
- Al personal de las Estaciones Experimentales de las Facultades de Agronomía de Salto y Paysandú por su excelente disposición durante la realización del trabajo de campo.
- A los docentes integrantes de los Laboratorios de Inmunología y Parasitología de la Regional Norte y a los funcionarios del Laboratorio de la Intendencia de Salto por facilitarme los materiales y el equipamiento de laboratorio necesarios.
- Al Director y Coordinador de la Estación Experimental de Facultad de Agronomía en Salto, Ing. Agr. Carlos Moltini y al Director de la Regional Norte- UDELAR, Dr Alejandro Noboa por su constante apoyo y calidad humana.
- A mis compañeros de la Regional Norte, de la Maestría, amigos y colegas por la motivación y la incondicionalidad.

Y a todos los que en su momento estuvieron junto a mí.

María Alexandra Bozzo de Brum

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La soja en la agricultura uruguaya	1
1.1.1 Localización del cultivo.....	2
1.1.2 Manejo del cultivo de soja.....	3
1.1.2.1. Caracterización de los sistemas de producción.....	3
1.1.2.2 Manejo de malezas.....	4
1.2 Impacto de los herbicidas en los microorganismos del suelo.....	6
1.2.1 Parámetros biológicos utilizados en las determinaciones de los efectos sobre los microorganismos del suelo	10
1.2.1.1 Características generales de los indicadores biológicos de la calidad del suelo.....	11
1.3 Características generales del glifosato.....	16
1.3.1 Mecanismos de acción.....	17
1.3.2 Comportamiento y persistencia del glifosato en el suelo.....	21
1.3.2.1. Degradación microbiana en el suelo.....	29
1.3.3. Efectos del glifosato sobre los microorganismos del suelo.....	34
1.3.3.1. Efectos positivos o neutros.....	34
1.3.3.2. Efectos negativos.....	36
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivos generales.....	41
2.2. Objetivos específicos.....	41
3. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	42
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
4.1. Caracterización del Área de Estudio.....	43
4.2. Diseño experimental.....	46
4.2.1. Características del cultivar y manejo del cultivo de soja.....	47
4.3. Metodología.....	49
4.3.1. Condiciones ambientales.....	49
4.3.2. Variables microbiológicas.....	50
4.3.3. Concentración de glifosato y AMPA en el suelo.....	51
5. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE DATOS.....	52
6. RESULTADOS.....	55
6.1 Factores ambientales.....	55

6.1.1 Temperatura del suelo.....	55
6.1.2 Agua disponible en el suelo.....	56
6.2 Variables microbiológicas del suelo.....	57
6.3 Variables glifosato y AMPA.....	67
6.4. Matriz de correlaciones.....	69
6.5. Análisis multivariado de Componentes Principales.....	69
7. DISCUSION.....	71
8. CONCLUSIONES.....	85
9. BIBLIOGRAFIA.....	88
10. ANEXOS.....	109

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas y físico-químicas del suelo Brunosol Eutrico Típico (Unidad de Suelo San Manuel).....	44
Tabla 2. Secuencia de cultivos entre los años 1993-2006.....	45
Tabla 3. Aplicaciones de agroquímicos durante el ensayo.....	48
Tabla 4. CO ₂ acumulado en la respiración microbiana.....	58
Tabla 5. Valores promedio de glifosato y AMPA determinados en las parcelas control al inicio y al final del experimento.....	68
Tabla 6. Valores promedio de glifosato (ppm) y AMPA (ppm) determinados en las parcelas control y tratadas al final del experimento.....	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1- Estructura química del glifosato.....	16
Figura 2. Síntesis del corismato.....	19
Figura 3- Esquema de los mecanismos involucrados en la adsorción de glifosato en el suelo.....	25
Figura 4. Metabolitos primarios y predominantes de la degradación microbiana en suelo: glioxilato y ácido aminometilfosfónico (AMPA).....	32
Figura 5- Degradación del glifosato por bacterias del suelo, con producción de los metabolitos ácido aminometilfosfónico (AMPA) y sarcosina.....	33
Figura 6- Diseño experimental del ensayo.....	46
Figura 7. Temperatura media del suelo Brunosol Eutrico de la Unidad San Manuel.....	55
Figura 8. Agua disponible como Almacenaje (%) en el suelo Brunosol Eutrico de la Unidad San Manuel.....	56
Figura 9. Valores promedio del CO ₂ acumulado en la respiración microbiana.....	59
Figura 10. Valores promedio de la biomasa microbiana en las parcelas control y tratadas.....	60
Figura 11. Valores promedio de la biomasa microbiana como promedio de las parcelas control y tratadas	61
Figura 12. Valores promedio de la respiración microbiana en las parcelas control y tratadas.....	62
Figura 13. Valores promedio de la respiración microbiana como promedio de las parcelas control y tratadas.....	63
Figura 14. Valores promedio del Coeficiente microbiológico (qMic).....	64
Figura 15. Valores promedio del Cociente de mineralización del carbono orgánico (qM).....	65
Figura 16. Valores promedio del Cociente Metabólico (qCO ₂).....	66
Figura 17. Valores promedio de glifosato y AMPA en los 190 días.....	67
Figura 18. Análisis multivariado de Componentes Principales (CP) de la matriz.....	70

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1.- Sistemas de producción del cultivo de soja en el Uruguay.....	109
ANEXO 2.- Ciclo del cultivo de soja.....	110
ANEXO 3.- Manejo del glifosato en el cultivo de soja.....	111
ANEXO 4.- Propiedades físico-químicas del glifosato.....	112
ANEXO 5.- Factores ambientales existentes en el ensayo, durante la primera, segunda y tercera aplicación del glifosato.....	114
ANEXO 6. - Balance Hídrico según el método de Thornthwaite y Mather (1955).....	115
ANEXO 7.- Valores de probabilidades de los efectos estudiados por período de estudio.....	116
ANEXO 8.- Ranking de valores promedio del efecto momento de muestreo para las variables respiración microbiana y (qM).....	117
ANEXO 9.- Ranking de valores promedio del efecto de la interacción: tratamiento por momento de muestreo para las variables respiración microbiana y (qM).....	117
ANEXO 10.- Ranking de valores promedio del efecto de los momentos de muestreo para las variables: respiración microbiana y qM.....	118
ANEXO 11.- Ranking de valores promedio del efecto de los tratamientos para las variables: respiración microbiana y (qM).....	118
ANEXO 12.- Valores promedio de las actividades enzimáticas.....	119
ANEXO 13.- Valores promedio de glifosato y AMPA determinados en las parcelas tratadas con glifosato.....	120
ANEXO 14.- Resultados de ANOVA para Glifosato y AMPA.....	121
ANEXO 15.- Determinación de la vida media del glifosato.....	121
ANEXO 16.- Determinación de la vida media del AMPA.....	122
ANEXO 17.- Promedio general y CV% de las variables microbiológicas, glifosato y AMPA.....	123
ANEXO 18. Análisis Multivariado de Componentes Principales.....	124

RESUMEN

Los estudios sobre la degradación de los productos fitosanitarios son esenciales para evaluar sus potenciales impactos en el ambiente y en los organismos benéficos. En particular, varios estudios señalan que los herbicidas afectan la actividad microbiana del suelo. El glifosato (N- fosfometil glicina) es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, post emergente, ampliamente usado en la agricultura. Con la llegada de los cultivos resistentes al glifosato se incrementaron las dosis totales por año y la frecuencia de las aplicaciones de este herbicida en el Uruguay. El control tardío de malezas (aplicaciones pos siembra) en soja solamente se justifica cuando éstas son de porte alto, como *Amaranthus sp* y *Solanum sisymbriifolium* o cuando se establecen estrategias de control del reingreso de malezas por semilla. En este último caso la maleza no interfiere con el cultivo pero es responsable de la resiembra de las malezas del próximo año; en este criterio de manejo, el control tardío tiene sentido para las malezas clasificadas como *transitorias*, con dependencia de la semillazón del año anterior (Raygrás). La implementación de esta estrategia de control de malezas en la rotación de cultivos es la responsable de las aplicaciones tardías de glifosato y explican el número de aplicaciones y dosis excesivas para el cultivo de soja que no se justifican ni por el enmalezamiento ni por el incremento de rendimiento. *Esta estrategia es la más utilizada a nivel de los productores del país.* Los objetivos de este estudio fueron evaluar los efectos de repetidas aplicaciones de glifosato sobre variables microbiológicas del suelo y determinar la vida media en el suelo del glifosato y ácido aminometilfosfórico (AMPA). Se trabajó en ensayos de soja de primera dentro de un sistema de agricultura continua en siembra directa, instalados desde hace 13 años en la Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC) ubicada a 10 km de Paysandú, Uruguay. El estudio fue realizado durante los años 2006-2007. El suelo corresponde a un Brunosol Eutricto Típico (Argiudol Típico) de la Unidad de Suelo San Manuel, con textura limo-arcillosa. Las parcelas tratadas con dosis de campo recomendadas (1,6 l/ha) de glifosato Ultra Max (74,7%) presentaron una aplicación pre-siembra y dos aplicaciones post-siembra del herbicida mientras que las parcelas control carecían de las tres aplicaciones sucesivas del herbicida en las cuales se realizó un control manual de malezas. Es de destacar que tanto las parcelas control como las tratadas presentaron entre 3 y 4 aplicaciones de glifosato durante 13 años. En este ensayo se evaluó el tamaño de la comunidad microbiana a través de la biomasa microbiana, la actividad microbiana metabólica total a través de la respiración y un grupo de enzimas que hidrolizan el FDA (diacetato de fluoresceína) y la actividad metabólica específica mediante las enzimas fosfatasa ácida y alcalina.

Los índices microbiológicos calculados fueron el cociente de mineralización del carbono orgánico (qM), el coeficiente microbiológico (qMic), el cociente metabólico (qCO₂) y las actividades enzimáticas relativas al carbono de la biomasa microbiana. Las variables microbiológicas respiración y biomasa microbiana fueron determinadas a los 0, 4, 8, 27, 31, 37, 64, 70, 73, 80, 94, 154 y 190 días del inicio del experimento. En los días correspondientes a las aplicaciones se realizó un muestreo antes y luego de la aplicación del herbicida. La respiración acumulada fue medida a partir de la tercera aplicación de glifosato y hasta 16 días de aplicado el herbicida. Las actividades enzimáticas fueron determinadas al inicio y al final del experimento. Las sucesivas aplicaciones de glifosato Ultra Max en el cultivo de soja a dosis recomendada de campo (1,6 l/ha) resultaron en cambios pequeños y transitorios en las variables microbiológicas evaluadas, si bien existieron diferencias significativas en el efecto promedio del momento en que se realizó el muestreo. La mayoría de las variables no presentaron diferencias significativas en los efectos promedios de los tratamientos y en los efectos promedio de la interacción entre tratamientos y momento de aplicación. Las variaciones observadas estuvieron más relacionadas a cambios estacionales (humedad, temperatura, rastrojos) que al efecto del herbicida. Esto pudo deberse fundamentalmente a la gran similitud existente en las parcelas tratadas y control debido a que todas estuvieron sometidas a 13 años de aplicaciones de glifosato, diferenciándose únicamente en las 3 aplicaciones sucesivas realizadas en las parcelas tratadas. El tratamiento control sin historia de glifosato, no se incluyó en este estudio ya que el objetivo fue trabajar en sistemas de agricultura continua en siembra directa, instalados durante 13 años. La respiración microbiana y el cociente de mineralización del carbono orgánico (qM) fueron afectados significativamente en el día 73 del inicio del experimento, que corresponde a 9 días luego de la tercera aplicación de glifosato. En la respiración microbiana ($p < 0,0189$), se liberó un 52,8% más de CO₂ en el control versus el tratado, obteniendo 354 mg CO₂ Kg⁻¹ suelo seco y 187 mg CO₂ Kg⁻¹ de suelo seco respectivamente. El qM, ($p < 0,0189$) presentó un valor de 76,5 mg C-CO₂. C-orgánico⁻¹)100 en el control versus 40,5 mg C-CO₂. C-orgánico⁻¹)100 en el tratado. Al día 80, los tratamientos control y tratado con glifosato no mostraron diferencias significativas en ninguna de las dos variables microbiológicas mencionadas indicando un efecto transitorio del herbicida sobre dichas variables. El comportamiento de la respiración microbiana y del qM se puede explicar por los niveles de AMPA presentes en el suelo en el día 70 del inicio del experimento. El análisis de los Componentes Principales muestra claramente la presencia de mayores valores de respiración microbiana, de qM y de qCO₂ asociada a menores niveles de AMPA.

Otro resultado relevante que surge de este análisis es que al inicio del experimento (antes de las tres aplicaciones sucesivas de glifosato), las parcelas (C2M0, C3M0 y T2M0), se encontraron agrupadas en la gráfica dentro del primer cuadrante, asociadas con los valores más elevados de q_M , respiración microbiana y qCO_2 y con valores menores de biomasa microbiana, q_{Mic} y AMPA. En las restantes variables microbiológicas medidas, biomasa microbiana, respiración acumulada, enzimas que hidrolizan el FDA, fosfatasa ácida y alcalina, q_{Mic} , el qCO_2 y las actividades enzimáticas relativas al carbono de la biomasa microbiana, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos con aplicaciones de glifosato y los controles. La ausencia de efectos de las aplicaciones sucesivas de glifosato sobre las actividades enzimáticas analizadas puede ser explicada debido a que las determinaciones fueron realizadas al inicio y al final del experimento, circunstancia que pudo no haber coincidido con los momentos de mayor efecto del herbicida y su derivado sobre la microbiota del suelo. Si bien la fosfatasa alcalina no resultó significativa al 5%, se encontró una tendencia en el promedio de los tratamientos ($P > 0,0758$). En este caso el efecto promedio del control sería superior al del tratado. En cuanto a la disipación del glifosato y AMPA en este suelo Argiudol Típico, evaluada inmediatamente después de la tercera aplicación del herbicida, se apreció que ésta siguió una cinética de primer orden con tiempos de vida media de 7 y 10 días respectivamente. Esta rápida disipación del herbicida y de su metabolito podría estar explicada principalmente a la intensa degradación microbiana asociada a la adaptación microbiológica producida durante los 13 años de aplicaciones sucesivas de glifosato y por los eventos de precipitaciones ocurridas durante el período de estudio. Dichas precipitaciones pudieron haber transportado verticalmente al glifosato y AMPA a horizontes subsuperficiales, fuera de la profundidad de muestreo. Residuos de glifosato y AMPA fueron detectados en el suelo 190 días luego de las aplicaciones realizadas en las parcelas control (momento de la cosecha de la soja), hecho que puede asociarse a la acidez del suelo, presencia de elevados tenores de arcillas (montmorillonita e illita) y materia orgánica que adsorben el herbicida afectando la degradación por la microbiota del suelo e incrementando la persistencia. Se concluye que si bien las aplicaciones sucesivas de este herbicida alteraron las actividades microbiológicas evaluadas, estos cambios fueron transitorios y de pequeña magnitud, evidenciando la presencia de una activa micropoblación capaz de degradar al glifosato y del ácido aminometilfosfórico (AMPA), estimulada por las reiteradas aplicaciones en este cultivo y a las condiciones ecológicas favorables para su metabolismo.

Además de las variables microbiológicas clásicas evaluadas en este estudio, surge la necesidad de incorporar la evaluación de poblaciones microbianas específicas (fijadores de N₂, nitrificantes, etc.) y aquellas no cultivables, mediante la evaluación de la biodiversidad microbiana ya que el glifosato actúa como agente de selección en la microbiota del suelo. Es necesario respetar las dosis recomendadas del glifosato en los distintos sistemas de manejo del suelo y en lo posible, limitar sus aplicaciones a lo estrictamente necesario, para no alterar la microbiota del suelo.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- La soja en la agricultura uruguaya

En Uruguay, el principal cultivo de verano es la soja, el cual continúa en franca expansión desde la zafra 2000/01, con 578000 has sembradas en primavera-verano 2008/2009 (DIEA, 2009). Es importante destacar el incremento de la exportación de la soja en el Uruguay desde el año 2001 al año 2007 con 10848 a 773,142 toneladas respectivamente. (DIEA 2007).

En nuestro país, prácticamente el 100% de la soja cultivada es genéticamente modificada, conocida como soja RR (*Roundup Ready*), la cual presenta la inserción de un gen de la bacteria *Agrobacterium sp.*, que le confiere resistencia al herbicida glifosato. Paralelamente aumentó la importación de productos fitosanitarios estrechamente relacionados con el cultivo de soja como el glifosato que en el período 2002 – 2006 aumentó más de un 100% y el endosulfán, clorpirifos, y cipermetrina que aumentaron 41, 16 y 79% respectivamente (Sistema de Información en Productos Fitosanitarios, MGAP - DGSA / Dpto. Control de Insumos). Estos datos permiten afirmar que el aumento del área agrícola y de la productividad está asociado a un uso más intensivo de pesticidas.

La soja RR, liberada a nivel mundial por la empresa Monsanto en el año 1996 es un organismo genéticamente modificado (OGM) a través de técnicas de ingeniería genética. Para la masificación de este OMG, fue fundamental la existencia de glifosato a bajo precio, lo que ocurrió desde comienzos de la década del 1990 a consecuencia del vencimiento de la patente que Monsanto tenía de este herbicida (desarrollado por la misma empresa), coincidiendo con el incremento de la difusión del sistema de siembra directa (SD). La adopción o recomendación del sistema de SD se ha visto favorecido dado que reduce la erosión y degradación de suelos (graves problemas ambientales en la agricultura uruguaya) (Scarlatto *et al.*, 2001). Una de las desventajas atribuibles a la siembra directa es la utilización de herbicidas para el control de malezas, ya que se ha demostrado que la principal razón del laboreo es el control de malezas (García Préchac, 1998). Sin embargo, una vez estabilizado el sistema de SD, es posible reducir el uso de herbicidas en las etapas de cultivo.

El glifosato es uno de los herbicidas más frecuentemente utilizado a nivel mundial en forestación, control de malezas acuáticas y agricultura (WHO, 1994; Martino, 1995; Rodríguez y Almeida, 1995), particularmente en el sistema de siembra directa (Martino, 1997). En el año 2006 se importaron productos fitosanitarios por casi a 62 millones dólares en valor CIF, donde el 40% del total correspondió al herbicida glifosato, con unas 5.457 toneladas de sustancia activa (DGSA, 2006).

1.1.1.- Localización del cultivo

Tomando la propuesta de regionalización climática para el Uruguay de Corsi (1982), citado por Blum, *et al.*, 2008) en el cual se realiza una caracterización de las distintas regiones del país según régimen térmico e hídrico para la aptitud de los diferentes cultivos; se desprende que para el caso de la soja existen tres grandes zonas: *el litoral noroeste, litoral norte y litoral sur*. De acuerdo a esta regionalización, Corsi sugiere que la zona más apta para el cultivo de soja desde el punto de vista térmico e hídrico sería el noreste del país. Sin embargo, la región en la que se desarrolla el cultivo de soja en la actualidad abarca las regiones de menor aptitud relativa. De esto se puede inferir que la localización geográfica del cultivo está determinada principalmente por las características de los suelos y por el desarrollo previo en la región de la infraestructura necesaria, los servicios, los menores costos de flete, etc; quedando en un segundo lugar las características hídricas y térmicas. A estas últimas, el cultivo de soja se adapta sin mayores inconvenientes ya que sus características anatómicas y fisiológicas le confieren plasticidad ante situaciones de estrés (Blum, *et al.*, 2008).

La soja es una planta de día corto que se caracteriza por poseer variedades de diversa respuesta al fotoperíodo. Estas variantes definen varios grupos de madurez para la soja según la sensibilidad al fotoperíodo. Hay grupos de madurez muy pocos sensibles al fotoperíodo (grupos 0, 00, 000), grupos de sensibilidad media (grupos: IV, V y VI) y grupos muy sensibles (grupos: IX, XX). Esta diferente respuesta a la duración del día define la ubicación en el tiempo de la etapa reproductiva (floración y fructificación) y por tanto la mayor o menor precocidad de cada grupo, donde cada cultivar presenta una franja latitudinal en la que se considera de ciclo medio. En nuestro país, los grupos que más se adaptan son los de sensibilidad media: IV, V, VI y VII, determinados por la latitud (30 a 35°C).

La fecha de siembra está definida por el grupo de madurez y su relación con el fotoperíodo, aunque también son definitorias la historia previa de la chacra (barbecho largo o cultivo de invierno), las condiciones ambientales al momento de la siembra (déficit o exceso de agua, baja temperatura del suelo) y durante el período crítico (R3-R5) (Baigorri, 2004).

1.1.2.- Manejo del cultivo de soja

1.1.2.1.- Caracterización de los sistemas de producción

De acuerdo a Blum *et al.*, 2008 en nuestro país la soja se cultiva en el marco de distintos sistemas de producción, dentro de los cuales se puede insertar de dos formas: como *cultivo de primera* o *cultivo de segunda*.

Un *cultivo de primera* es aquel que se siembra al inicio de la estación de crecimiento posible, luego de haber realizado en tiempo y forma todas las labores necesarias para una buena implantación del cultivo. Por su parte, *un cultivo de segunda*, es aquel que se siembra inmediatamente después de la cosecha de un cultivo de invierno, en general, en fechas más tardías para cuya siembra no se dispuso del tiempo necesario para realizar todas las labores.

Es posible distinguir principalmente tres grandes sistemas en los que se inserta la soja: *rotaciones cultivos-praderas, agricultura continua y soja continua de primera*. (**Anexo 1**).

Las *rotaciones cultivos-praderas* son los sistemas productivos característicos del litoral del país desde hace 40 años. Se distinguen por combinar la actividad agrícola con la ganadería sobre todo de invernada bajo la modalidad de rotaciones.

El *sistema de agricultura continua* presenta menor importancia en superficie que el anterior. Su característica particular es que se establece una secuencia de cultivos agrícolas sin incluir una etapa de pasturas, por lo que solo presentan una secuencia de distintos cultivos agrícolas en una misma parcela.

Si bien son sistemas con bastante data en el país, se ha incrementado su frecuencia con la masificación de la siembra directa y, fundamentalmente, la alta rentabilidad que los cultivos agrícolas han tenido en los últimos años, que desechan la posibilidad de insertar pasturas en el sistema.

El sistema de soja continua de primera ha tenido gran difusión desde el año 2003-2004. Se caracteriza por establecer una secuencia continua de cultivos de soja de primera, intercalando en invierno barbechos o eventualmente verdeos (conocidos como “cultivos de cobertura”) lo que garantiza que siempre exista el tiempo suficiente para realizar todas las labores necesarias para una buena implantación. Este sistema, predominante en el período 2003-2005, perdió importancia relativa en los últimos años.

1.1.2.2.- Manejo de malezas

Cassarino (1974); Astaziarán y Ceretta, (1984); Belgeri y Caulín (2008), manifiestan que la soja, por su escaso desarrollo inicial y por su tardanza en cubrir el suelo, es muy susceptible a la competencia establecida por las malezas. Numerosos experimentos demuestran que las malezas, por su acción competitiva en la extracción de humedad y nutrientes, por los problemas que crea a la cosecha, etc, pueden llegar a reducir en un 50% o más los rendimientos de un cultivo de soja. Según los autores Baker (1974) y Marzocca (1976), *maleza* es “una planta que crece siempre o de forma predominante en situaciones marcadamente alteradas por el hombre y que resulta no deseable por él en un lugar y momento determinado”.

Uno de los aspectos más importantes para el manejo del enmalezamiento es conocer el *período crítico* de competencia del cultivo. Este es el período durante el cual el cultivo debe permanecer sin malezas, con vistas a minimizar las pérdidas de rendimiento.

Para el cultivo de soja el *período crítico de competencia* tiene lugar entre la cuarta y sexta semana después de la emergencia del cultivo, lo que corresponde a 5 *hojas unifoliadas desarrolladas* (V 5 en la escala de desarrollo fenológico de cultivo) (**Anexo 2**). Sería por lo tanto fundamental que el cultivo esté libre de malezas hasta ese estadio, ya que aquellas que emerjan con posterioridad no afectarán el rendimiento (Vitta, 1997).

En el control químico de las malezas, se destacan las aplicaciones de pre-emergencia y las aplicaciones de post-emergencia. En el primer caso, las aplicaciones son realizadas inmediatamente luego de la siembra del cultivo y antes de la emergencia de las malezas, debiendo ser realizada con el suelo húmedo. En el segundo caso, la aplicación se efectúa luego de la germinación del cultivo y de las malezas, y el control más eficiente cuanto más jóvenes son las malezas. En la soja común, el glifosato es aplicado como desecante y también en la post-emergencia de las malezas y en la soja modificada genéticamente es aplicado en la pre y post-emergencia de las malezas (Bergson, *et al.*, 2008).

El manejo en concreto implica una secuencia de prácticas que varían según se trate de soja de primera después de pradera o campo natural, soja de primera después de soja u otro cultivo de verano o soja de segunda. Usualmente el cultivo de soja recibe entre tres y cinco aplicaciones. Se realizan entre una y tres aplicaciones previas a la siembra, dependiendo del tipo y largo del barbecho, y aproximadamente dos aplicaciones durante el cultivo (Blum, *et al.*, 2008) (**Anexo 3**).

El control tardío de malezas (aplicaciones pos siembra) en soja solamente se justifica cuando éstas son de porte alto, como *Amaranthus sp* y *Solanum sisymbriifolium* (Crespo y Longinoti, 1988; Arrieta y Mezquida, 1996) o cuando se establecen estrategias de control del reingreso de malezas por semilla (Arrieta y Mezquida, 1996; Cujó y Martínez, 2001). En este último caso la maleza no interfiere con el cultivo pero es responsable de la resiembra de las malezas del próximo año; en este criterio de manejo, el control tardío tiene sentido para las malezas clasificadas como *transitorias*, con dependencia de la semillazón del año anterior (Raygrás). La implementación de esta estrategia de control de malezas en la rotación de cultivos es la responsable de las aplicaciones tardías de glifosato y explican el número de aplicaciones y dosis excesivas para el cultivo de soja que no se justifican ni por el enmalezamiento ni por el incremento de rendimiento. *Esta estrategia es la más utilizada a nivel de los productores del país.*

Bohm *et al.*, (2008) detectaron que las aplicaciones de glifosato en post-emergencia, en el control de malezas durante el cultivo de soja transgénica en un suelo Planosol de Brasil, resultó en residuos de la molécula en los granos, sobrepasando el *límite máximo de residuos* (LMR) permitido por la legislación brasilera, así como también la presencia de ácido aminometilfosfórico (AMPA), principal metabolito de degradación del glifosato, en granos y en el suelo. La recomendación técnica prescrita en el registro comercial que contiene glifosato para la aplicación post emergente en soja RR, es de 1 a 1,5 l ha⁻¹ (480 a 2400 g de ingrediente activo ha⁻¹) dependiendo de la marca comercial del producto. El *tiempo de espera que corresponde a los días entre la última aplicación del producto hasta la cosecha*, para la utilización del glifosato es de 56 días. Respetadas las dosis de aplicación y el tiempo de espera, supuestamente, los límites de residuos en el grano serán mantenidos por debajo del rango establecido por la legislación vigente que es de 10 mg.kg⁻¹. El LMR de glifosato para la soja RR, se define como: “la concentración máxima autorizada del residuo de un pesticida en el interior y en la superficie de los alimentos”. Es de resaltar que hasta el año 1994, el límite máximo de glifosato permitido en los granos era de 0,2 mg.kg⁻¹, y a partir de ese momento, se aumentó 50 veces ese límite para la soja RR pasando a 10 mg.kg⁻¹ (ANVISA, 2007).

En este experimento se realizó un tratamiento de una aplicación de 960 g ia ha⁻¹ a los 28 días de la siembra de la soja RR y otro tratamiento de dos aplicaciones de 960 g ia ha⁻¹ a los 28 días y a los 56 días de la siembra del cultivo, encontrándose 19 mg kg⁻¹ y 36 mg kg⁻¹ de glifosato en los granos respectivamente. Los tenores de glifosato detectados en los granos por BOHM *et al.*, (2008) son superiores a los tenores máximos permitidos por la legislación vigente, así como superiores a los detectados previamente por DUKE *et al.*, (2003), a pesar que las dosis utilizadas por estos últimos autores hayan sido mayores. Las causas probables de esas diferencias aún no son conocidas, pero es probable que la metabolización de la molécula en la planta sea dependiente, además del genotipo, de las condiciones edafoclimáticas durante el cultivo, como es citado por REDDY *et al.*, (2004). Al monitorear las concentraciones de AMPA, el comportamiento fue similar, o sea, en la soja tratada una vez con glifosato, el residuo fue de 9mg kg⁻¹ y en las parcelas tratadas dos veces, se detectaron 12mg kg⁻¹. Este hecho explica claramente que la *cantidad de residuos en grano se incrementa con el número de aplicaciones*.

Estudios realizados por Arregui *et al.*, (2004) en Santa Fe (Argentina) sobre la presencia de glifosato y AMPA en la soja transgénica, mostraron que las hojas y los tallos acumularon 1,9 a 4,4 mg/kg respectivamente y en los granos de 0,1 a 1,8 mg kg⁻¹. Las mayores concentraciones fueron detectadas cuando el glifosato fue aplicado *varias veces durante el ciclo del cultivo*, y cuando los tratamientos *se aproximaron a la floración*. Los residuos de AMPA también fueron detectados en hojas y en granos, indicando la translocación y metabolismo del herbicida en la totalidad de la planta. El presente estudio demostró que los residuos de glifosato y AMPA existen en la soja transgénica.

1.2.- Impacto de los herbicidas en los microorganismos del suelo

El uso de pesticidas se viene cuestionando cada vez más en los últimos años, con aspectos que incluyen la potencial acumulación de residuos en el suelo debido a repetidas aplicaciones en el cultivo y los efectos negativos sobre los microorganismos del suelo, con consecuencias adversas en la fertilidad del suelo en el largo plazo (Bromilow *et al.*, 1996).

Los microorganismos son de extrema importancia en los procesos biogeoquímicos del suelo, a pesar de ocupar menos del 1% de su volumen.

La microbiota del suelo es responsable de la ejecución y el control de funciones esenciales como la descomposición de la materia orgánica, producción de humus, reciclaje de nutrientes, flujo de energía, fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de nutrientes esenciales, como el fósforo, producción de compuestos complejos que causan la agregación del suelo, descomposición de xenobióticos y también control biológico de plagas y enfermedades (Moreira y Siquiera, 2002).

La cantidad y la diversidad de los microorganismos del suelo son extremadamente importantes en los procesos metabólicos del suelo, debido a que afectan la descomposición de la materia orgánica contribuyendo a la fertilidad del suelo (Bromilow *et al.*, 1996; Andrea *et al.*, 2000). La preservación de la integridad de la capacidad metabólica de la microbiota se considera un requerimiento fundamental para el mantenimiento de la calidad del suelo (Alef *et al.*, 1995).

En tal sentido está comprobado que las prácticas de manejo asociadas a la intensificación de la agricultura (Giller *et al.*, 1997) y en particular, las asociadas al uso de pesticidas (Wairwright, 1998; Moorman, 1989; Wardle *et al.*, 1991) pueden alterar intensamente la funcionalidad de la microbiota, por la influencia tanto en la cantidad como en la actividad de los microorganismos del suelo.

La biota del suelo comprende aquella que es beneficiosa para la agricultura y a los organismos patógenos causantes de diversas enfermedades que afectan la productividad. La relación entre biodiversidad y funcionamiento del ecosistema parece no ser lineal, aunque la hipótesis de “seguridad” planteada por Loreau y Yachi (1999) sugiere que una alta *biodiversidad* confiere mayor seguridad contra el mal funcionamiento del ecosistema bajo estrés o perturbación. De esta hipótesis se desprende que si la biodiversidad del suelo le confiere resistencia y resiliencia, entonces también está relacionada con el uso eficiente de recursos naturales como el agua y nutrientes (Brussaard *et al.*, 2007).

Las comunidades biológicas suelen contener pocas especies con muchos individuos y numerosas especies con pocos individuos. Generalmente la diversidad disminuye cuando unas pocas poblaciones alcanzan densidades altas, los números elevados indican que una población individual ha superado con éxito la competencia y ha logrado dominar en la comunidad. La diversidad de especies de una comunidad permite gran variedad de respuestas en un ecosistema dinámico. Generalmente, la diversidad microbiana en algunos habitats como el suelo y el agua es alta, en cambio en condiciones de estrés o cuando se producen perturbaciones la diversidad es muy baja (Atlas y Bartha, 2002).

Mientras el uso intensivo de herbicidas pueden causar efectos adversos en la microbiota del suelo (Araújo *et al.*, 2003), los microorganismos exhiben en general una gran adaptabilidad en respuesta al impacto causado por los xenobióticos, que es evidenciada por el restablecimiento de la actividad metabólica. Los mecanismos por los cuales esto puede suceder, involucran el reemplazamiento de especies sensibles por otras tolerantes o por una rápida recolonización del ambiente luego de la aplicación del pesticida (Frioni, 1999).

El estudio de las comunidades microbianas ha sido limitado, ya que sólo se conoce una pequeña fracción de los microorganismos utilizando las metodologías convencionales de microbiología, que implican el aislamiento y desarrollo de un microorganismo en un medio de cultivo en el laboratorio. Se desconocen las condiciones de crecimiento para muchas bacterias y se estima que en muestras ambientales el 90-99 % de los microorganismos no son cultivables (Rosado *et al.*, 1997).

Los avances metodológicos en ecología microbiana han incrementado el conocimiento sobre la composición de las comunidades microbianas del suelo y con ello el entendimiento de la relación entre composición de las comunidades y los procesos del suelo. Muchos de estos métodos extraen componentes celulares de los microorganismos directamente del suelo y permiten identificar y detectar poblaciones microbianas sin necesidad de aislar o cultivar. Ejemplos de estos métodos son aquellos basados en la extracción y análisis directo de los ácidos nucleicos.

Los avances más importantes de los últimos años en ecología microbiana para la detección y el estudio de la diversidad se deben a la aplicación de técnicas moleculares basadas en los ácidos nucleicos (Rossello-Mora y Amann, 2001). Para el estudio de la diversidad es necesario contar con un marcador molecular y el más utilizado ha sido el gen del 16S rDNA (Woese *et al.*, 1987). Los métodos utilizados están principalmente basados en la amplificación por PCR de biomarcadores como el gen del 16S rDNA u otros genes específicos que definen grupos bacterianos y la posterior resolución de amplicones de similar tamaño, pero que difieren en secuencia. Estas diferencias en la secuencia son detectados mediante técnicas como el DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) (Muyzer *et al.*, 1993) o su equivalente TGGE (*temperature gradient gel electrophoresis*) (Muyzer *et al.*, 1998) y más recientemente T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Liu *et al.*, 1997). Estos procedimientos permiten acceder a la comunidad total y evaluar los cambios en su diversidad genética frente a perturbaciones ambientales o cambios en la estructura comunitaria en el tiempo.

El uso de herbicidas es un factor importante en la agricultura actual, constituyendo una práctica esencial y generalizada. Por esta razón, el control de malezas constituye uno de los principales factores antropogénicos con potencialidad de alterar la microbiota de los suelos agrícolas (Sannino y Gianfreda, 2001).

Los resultados de los experimentos desarrollados en las últimas décadas en esta temática señalan una amplia variabilidad de los efectos de los herbicidas en los microorganismos del suelo, tanto en la naturaleza como en la magnitud, en función, principalmente, del herbicida y de las dosis utilizadas (Wardle y Parkinson, 1990).

Por otro lado, el proceso bioquímico del suelo alterado por la acción del herbicida puede ser fundamental en la determinación de la productividad de un cultivo o sistemas de cultivos en particular, independiente del potencial de recuperación posterior (Wardle *et al.*, 1994).

La importancia de la actividad microbiana en el reciclaje de la materia orgánica y en la regulación del pool de nutrientes, sugiere que los efectos del estrés sobre la microbiota del suelo están fuertemente relacionados con los efectos en el cultivo, en la vegetación natural y en la productividad del ecosistema (Killham, 1985). El uso repetido de herbicidas del mismo grupo químico por extensos períodos, sin considerar los intervalos requeridos para la debida recuperación de la funcionalidad de la microbiota del suelo, puede desencadenar alteraciones de difícil reversibilidad (Wardle *et al.*, 1994).

La actividad de los microorganismos en los suelos es la principal determinante de la degradación de los herbicidas. De la misma depende básicamente tanto la tasa como el grado en que los herbicidas son degradados. Un aspecto adicional de importancia en la determinación de los impactos es la consideración de la reversibilidad de los efectos de los pesticidas en el suelo (Fernandez, 2007).

Domsch *et al.*, (1983), citados por Moreira y Siquiera (2002), analizaron un total de 48 estudios publicados para determinar el tiempo necesario para que la comunidad microbiana se recupere del estrés provocado por los pesticidas. Señalaron que en 30 casos analizados hubo una recuperación en menos de 30 días y que solamente en dos casos fueron necesarios más de 60 días para la recuperación del nivel original. Concluyeron que en general, los efectos de los pesticidas sobre la biota son de corta duración.

En condiciones reales, los efectos sobre la microbiota presentan gran variabilidad en función de la naturaleza química del herbicida, la dosis, momento y forma de aplicación, tipo de suelo, cultivo establecido y manejos culturales, pudiendo alterar fuertemente las respuestas (Fernandez, 2007).

1.2.1.- Parámetros biológicos utilizados para la determinación de los efectos sobre los microorganismos del suelo

Resulta de sumo interés contar con parámetros biológicos que puedan ser empleados en forma rápida y sencilla y que evidencien cambios en los ecosistemas, inducidos por efecto clima, prácticas de manejo, contaminación, rotaciones de cultivos y que a su vez se correlacionen con las características físicas y químicas del suelo, como el contenido de carbono total, nitrógeno, fósforo, fracciones húmicas, estabilidad de agregados y microporosidad. En general, los parámetros físicos y físico-químicos son poco utilizados porque se alteran solamente cuando el suelo experimenta cambios drásticos.

Por el contrario, los parámetros biológicos y bioquímicos son sensibles a leves modificaciones que el suelo puede sufrir en presencia de algún agente degradativo (Filip, 2002; Nannipieri *et al.*, 2003; Raiesi, 2006). En tal sentido, los microorganismos son potencialmente buenos indicadores por responder a prácticas de manejo de suelos en cortos períodos de tiempo (meses, años) y fáciles de evaluar. Por ejemplo, cambios en biomasa microbiana, o en la abundancia de grupos funcionales de microorganismos (hongos micorrízicos, microorganismos celulolíticos) pueden ser detectados antes de evidenciar cambios en la materia orgánica del suelo u otras propiedades físicas y químicas del mismo (Sparling, 1992).

El suelo es un medio heterogéneo debido a la variabilidad en sus constituyentes físicos, químicos y biológicos. Las características físico-químicas del suelo generan microhabitats en los que se pueden desarrollar complejas poblaciones de bacterias, siendo la variabilidad en los factores microbiológicos mayor que la variabilidad en los parámetros físicos y químicos (Rovero y Kaiser, 1999). Se ha encontrado una enorme variabilidad espacial (horizontal y vertical en suelos agrícolas) y temporal (estacional) para los diferentes parámetros microbiológicos del suelo que incluyen el tamaño de la biomasa (Fierer *et al.*, 2003a; Stenrod *et al.*, 2006), actividad biológica total (Fierer *et al.*, 2003b, Stenrod *et al.*, 2006), la estructura de la comunidad (Fierer *et al.*, 2003a) y la actividad degradativa de los pesticidas.

Estas propiedades han mostrado ser intensamente gobernadas por las variables ambientales: temperatura, humedad del suelo y la disponibilidad de sustrato (Fierer *et al.*, 2003a) ocasionando temporalmente, nichos dentro del perfil del suelo.

Según Weber *et al.*, (1993) la humedad del suelo y la temperatura afectan directamente varios procesos biológicos, incluyendo el metabolismo de la planta y la degradación microbiana, y por lo tanto influyen en la biodisponibilidad y persistencia de los químicos.

Generalmente, las propiedades bioquímicas relacionadas con los ciclos biogeoquímicos de los elementos (C, N, P y S) son utilizados para diagnosticar la calidad del suelo. Estas propiedades incluyen *parámetros bioquímicos generales* (biomasa microbiana, respiración del suelo, actividad deshidrogenasa, mineralización potencial del N, capacidad hidrolítica de FDA) y *parámetros bioquímicos específicos* (la actividad de enzimas hidrolíticas, como la fosfatasa, ureasa y B glucosidasa).

Los mayores problemas asociados al uso de las propiedades bioquímicas del suelo como indicadores de la calidad del suelo incluyen la falta de *valores de referencia* debido al alto grado de variabilidad espacial y temporal.

Además existe una gran dificultad en comparar los valores obtenidos en un experimento con aquellos de otro porque se obtienen, en general, con diferentes protocolos experimentales (en especial en el caso de actividades enzimáticas), o debido a que las muestras de suelo estuvieron sujetas a diferentes tratamientos (colecta de las muestras, profundidad de muestreo, etc), antes de ser analizadas (Gli-Sotres *et al.*, 2005).

1.2.1.1.- Características generales de los indicadores biológicos de la calidad del suelo

La *biomasa microbiana* es definida como el componente biótico de la materia orgánica del suelo (Jenkinson y Ladd, 1981) pero excluye la microfauna y las raíces. A pesar que la biomasa microbiana generalmente abarca menos del 5% de la materia orgánica del suelo (Dalal, 1998), constituye uno de los componentes esenciales de todos los ecosistemas terrestres; regula procesos críticos como son, la descomposición de materiales orgánicos, reciclaje de nutrientes, degradación de compuestos orgánicos xenobióticos, inmovilización de metales pesados, así como contribuye a la formación de los suelos y está directamente relacionada con el contenido total de materia orgánica (Nannipieri, 2003).

La biomasa microbiana puede ser un indicador sensible de los suelos por tener mayor tasa de recambio que la materia orgánica total del suelo (Jenkinson y Ladd, 1981). Debido a que pueden ser detectados cambios significativos en la biomasa microbiana mucho tiempo antes que se perciban cambios en la materia orgánica del suelo, se propone su uso como indicador inicial de las alteraciones previsibles por efectos de prácticas agrícolas diversas como fertilizaciones o aplicación de pesticidas, entre ellos, los herbicidas (Wardle y Parkinson, 1991; Kinney *et al.*, 2005).

La disminución de la biomasa microbiana del suelo puede ser un buen indicador de la pérdida de calidad del suelo, y a largo plazo, puede predecir tendencias en el contenido total de materia orgánica (Powlson *et al.*, 1987).

Debido a que muchas bacterias pueden existir en formas inactivas (Kell *et al.*, 1998, citado por Mijangos, *et al.*, 2009), es importante utilizar medidas que consideren la actividad biológica en las investigaciones, de modo que se evalúa la relevancia ecológica de los microorganismos y no las células inactivas que no contribuyen en el funcionamiento del ecosistema. (Ellis *et al.*, 2003, citado por Mijangos *et al.*, 2009).

Los efectos de los contaminantes pueden ser directos, ocasionando la muerte de los microorganismos o disminuyendo el aprovechamiento del sustrato, resultando en la disminución de la biomasa microbiana (Brookes, 1995).

Andrea y Pettinelli (2000) verificaron que, aunque temporario, el efecto de los pesticidas puede ser inhibiendo o estimulando la biomasa microbiana, dependiendo del tipo de suelo cuyas propiedades producen un fuerte impacto sobre la tasa de crecimiento de la biomasa.

Haney *et al.*, (2002), para evaluar los efectos del glifosato en los microorganismos del suelo, seleccionaron la biomasa microbiana, la actividad respiratoria y la mineralización del N como indicadores de la actividad microbiana debido a que estos métodos son generalmente sensibles a sustratos de baja relación C/N, como la del glifosato (C/N de 3:1).

La *actividad respiratoria del suelo* es un parámetro adecuado para monitorear actividades degradativas (Anderson, 1982), pero su evaluación puede presentar grandes fluctuaciones dependiendo de la disponibilidad de sustratos, la humedad y la temperatura (Alvarez *et al.*, 1997).

Los organismos del suelo pueden responder muy rápidamente a cambios en las condiciones de éste, incluso luego de largos períodos de inactividad y su consideración en forma individual dificulta su interpretación en términos de salud del suelo (Brookes, 1995).

Alteraciones de la respiración microbiana pueden reflejar cambios en la materia orgánica del suelo, cambios en el reciclaje de nutrientes, impacto de los factores del suelo así como el impacto de los xenobióticos introducidos en el suelo. Por lo tanto, al interpretar los resultados se debe tener en consideración también la posible influencia de las propiedades del suelo (Hoffman, 2003).

Los estudios de los efectos de los polucionantes en los suelos citan frecuentemente disminuciones en la respiración. Por lo tanto, la interpretación de estos decrecimientos no siempre es fácil, en la medida que los niveles de la respiración reflejen también los requerimientos energéticos de la microbiota. La energía de mantenimiento de las comunidades microbianas se incrementa en respuesta al efecto de factores antropogénicos o naturales y en consecuencia, aumentan los requerimientos de las fuentes de energía (Killham, 1985).

Varios indicadores biológicos como la respiración, la biomasa total, se correlacionan con *actividades enzimáticas*: deshidrogenasas, proteasas, celulasas, fosfatasas, beta-glucosidasas, ureasas. Las enzimas presentes en el suelo son mediadores y catalizadores de funciones importantes que incluyen: i) descomposición de residuos orgánicos, ii) transformación de la materia orgánica nativa, iii) liberación de nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas, v) fijación de N₂, vi) biorremediación, vii) nitrificación, viii) pérdida de elementos como el C, N, S y otros.

Las enzimas se presentan generalmente asociadas a células vivas (intracelulares) o como enzimas extracelulares. Una dificultad inherente al estudio de las enzimas del suelo es que del total de las encontradas, solamente una pequeña fracción de éstas pudo ser extraída del mismo. Como consecuencia los estudios se realizan midiendo una actividad directamente en los suelos. Los ensayos se basan en el agregado de solución de sustrato de concentración conocida a una determinada cantidad de suelo que se incuba en condiciones adecuadas de temperatura, pH, potencial iónico, etc. Se evalúan actividades potenciales y no las reales que pueden ocurrir *in-situ*.

A excepción de unas pocas enzimas como las deshidrogenasas, la mayor parte de las estudiadas en los suelos abarcan una parte significativa de la actividad enzimática extracelular, que son excretadas en la matriz del suelo, o liberadas como consecuencia de la lisis celular o como desechos celulares. Estas pueden ser rápidamente degradadas, pero algunas son estabilizadas en la matriz del suelo manteniendo su actividad catalítica lo que puede dar lugar a problemas de interpretación debido a la falta de certeza en cuanto a su origen (Boyd y Mortland, 1990).

Grandes cantidades del fósforo están formando parte de compuestos orgánicos en muchos suelos y la mineralización de los mismos resulta de gran relevancia agrícola y económica. Dichos compuestos pueden constituir entre el 5 y 50% del total del fósforo y la asimilación del mismo por las plantas y los microorganismos es mediatizado por enzimas del suelo (Jennings, 1995).

En los ecosistemas agrícolas, la limitante de fósforo es mucho más crítica debido a que el mismo es removido del sistema con la cosecha del cultivo y solamente una pequeña cantidad retorna al suelo mediante el rastrojo y estiércol animal. Como resultado existen comúnmente grandes deficiencias de fósforo cuando no se aplican fuentes de suplementación al suelo. Dentro de las hidrolasas, la *actividad de la fosfatasa ácida y alcalina* ha sido la más frecuentemente utilizada para estimar los cambios en la calidad del suelo debido al manejo o la presencia de contaminante. Es un buen índice de la calidad y cantidad de materia orgánica del suelo (Jordan *et al.*, 1995).

Las *enzimas hidrolíticas del diacetato de fluoresceína (FDA)* constituyen un grupo de enzimas de amplio espectro. Proveen un indicador general de la actividad hidrolítica del suelo llevada a cabo por proteasas, lipasas y esterases las que son abundantes en el suelo; la capacidad de hidrolizar el FDA es generalizada entre los hongos y las bacterias. Por lo tanto, la cuantificación de la hidrólisis refleja una buena estimación de la actividad microbiana total (Silva *et al.*, 2005). Estas enzimas, por ser extracelulares, están protegidas generalmente de la degradación por la adsorción a las arcillas o sustancias húmicas dando lugar a su acumulación en el suelo, pudiendo no ser tan sensibles a como las asociadas a las células microbianas (Nannipieri, 1994, citado por Silva, 2005).

Resulta difícil escoger una o más enzimas como indicadores. La enzima más apropiada es aquella que está directamente asociada a la actividad microbiana y es rápidamente inactivada cuando la cuando la célula muere. (Nannipieri, 1994).

Muchos *índices microbiológicos* que relacionan parámetros biológicos con características del suelo (Moscatelli *et al.*, Raiesi, 2007), como el cociente de mineralización del carbono orgánico (qM), coeficiente microbiológico (qMic), las actividades enzimáticas relativas (actividad enzimática por unidad de carbono de la biomasa) o el cociente metabólico (qCO₂) (Moscatelli *et al.*, 2005), son empleados también como indicadores. Los índices son en general, más sensibles a cambios en el suelo que los indicadores biológicos utilizados aisladamente (Alvarez *et al.*, 1997; Nsabimana *et al.*, 2004). Como estos índices representan una proporción, se evita el problema de trabajar con valores absolutos y permite compara suelos con diferentes contenidos de materia orgánica (Wardle y Ghani, 1995).

El *coeficiente microbiológico* se define como qMic y es el carbono de la biomasa microbiana expresado como porcentaje del carbono total: $(C\text{-biomasa microbiana}/\text{carbono orgánico}) \times 100$ y refleja la contribución potencial de la biomasa microbiana al carbono orgánico del suelo, también indica la disponibilidad del sustrato a los microorganismos del suelo o, por el contrario, la fracción de la materia orgánica recalcitrante en el suelo. Varios autores han sugerido que el cociente entre el $(C\text{-biomasa}/C\text{ orgánico}) \times 100$ ó la relación entre la respiración y la biomasa (qCO₂) reflejan el balance entre la entrada y salida de la materia orgánica del suelo. En realidad el qMic declina a medida que la cantidad de materia orgánica disponible disminuye. (Anderson, 2003; Chaer y Tótoła, 2007).

El *cociente metabólico* (qCO₂) mide la respiración de la comunidad por unidad de carbono de la biomasa y ha sido ampliamente usado. Es reconocido que presenta una valiosa aplicación como una medida relativa de cuan eficiente es la biomasa microbiana del suelo utilizando fuentes de C y el grado de limitación de sustrato para los microorganismos del suelo (Wardle y Ghani, 1995).

El *cociente de mineralización del carbono orgánico* (qM) mide la respiración de la comunidad por unidad de C orgánico del suelo y se expresa como: $(C\text{-CO}_2/C\text{-orgánico}) \times 100$. La descomposición rápida de la materia orgánica no es deseable necesariamente porque la materia orgánica estabilizada ejerce un importante rol en las características físicas y químicas del suelo. Por otro lado, la degradación de los residuos orgánicos es una característica deseable debido a que los nutrientes se van liberando a medida que la planta los requiere (Dommergues y Mangenot, 1970).

1.3.- Características generales del glifosato

El glifosato es un derivado del aminoácido glicina, con ácido fosfórico unido al radical amino. El glifosato en si mismo es un ácido pero comúnmente es utilizado en forma de sal, más comúnmente como sal de isopropilamina. Las sales más utilizadas son la isopropilamina de glifosato e isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina (Martino, 1995) (Fig.1).

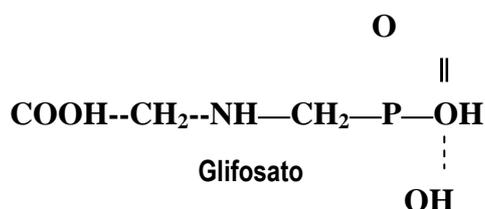


Figura 1- Estructura química del glifosato (Martino, 1995).

Se comercializa principalmente con el nombre de ROUNDUP, el que contiene 36% de equivalente ácido y 48% de equivalente sal (Martino, 1995). Dado que no es capaz de atravesar las cutículas foliares y membranas celulares hidrofóbicas de las malezas, las formulaciones comerciales contienen un agente surfactante, que ayuda a superar dichas barreras (Martino, 1995; Franz *et al.*, 1997). Varias investigaciones sugieren que los efectos tóxicos vinculados con el ROUNDUP no provienen de su componente activo, el glifosato, sino de uno de sus surfactantes: polioxietil- amina (POEA) (Burger *et al.*, 2004).

Estudios recientes han demostrado que el POEA es extremadamente tóxico para los organismos acuáticos. Dicho surfactante es un disruptor respiratorio de las membranas de los organismos acuáticos. El POEA inhibió el crecimiento del macroinvertebrado *Daphnia magna* y puede causar similares efectos en otros organismos acuáticos (Brausch y Smith, 2007). Las concentraciones de glifosato utilizadas en la agricultura pueden causar cambios en los parámetros metabólicos y enzimáticos de los peces, como es la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), la peroxidación de los lípidos y el catabolismo de la proteína. La evaluación de dichos parámetros pueden ser utilizados para monitorear la toxicidad del glifosato (Roundup) en el bagre plateado (Gluszczac *et al.*, 2007).

En un estudio realizado por Tsui y Chu (2003), se encontró que el orden de toxicidad de las sustancias químicas en ambientes acuáticos para las bacterias, microalgas, protozoarios y crustáceos fue: POEA >Roundup > glifosato ácido > isopropilamina (IPA) de glifosato.

1.3.1.- Mecanismos de acción

Es un herbicida post-emergente, sistémico, de amplio espectro con una alta actividad sobre casi todas las malezas (anuales, perennes, mono o dicotiledóneas), siendo solamente resistentes aquellas variedades modificadas genéticamente (Who, 1994; Martino, 1995; Rodríguez *et al.*, 1995; Araújo *et al.*, 2003).

El carácter sistémico del glifosato permite que el producto, luego de ser absorbido por el follaje, se trasloque a través de los tallos y raíces a la planta entera. Este herbicida es particularmente efectivo porque la mayoría de las plantas lo metabolizan muy lentamente o no lo degradan lo que explica su acción no-selectiva. Finalmente el herbicida se acumula preferentemente en los tejidos metabólicamente activos como son los tejidos meristemáticos. Sin embargo, se han detectado residuos de glifosato y AMPA en cultivos celulares de soja, en plantas y frutos de frutilla y de árboles forestales. En las plantas susceptibles, el herbicida no es ni degradado ni metabolizado en un grado significativo (Prata *et al.*, 2003).

El glifosato se distribuye en los vegetales a través de una translocación simplástica, utilizando la vía de la fotosíntesis, particularmente útil para matar órganos subterráneos de plantas perennes que tienden a prosperar en pasturas y sistemas de agricultura conservacionista. El sistema simplasto constituye el protoplasma a lo largo de la planta, incluyendo el citoplasma de cada célula, la plasmadesmata y el floema; consideradas la parte viva de la planta (Robert *et al.*, 1998).

Los herbicidas móviles por simplasto, que son absorbidos por las hojas, se mueven junto con los fotosintatos por la misma vía, llegando a las raíces u otros órganos de reserva donde se acumulan. Por lo tanto, las condiciones que aseguran la actividad fotosintética (temperatura, humedad, luz) promoverán la translocación del glifosato. Por ello actúa más eficazmente sobre las plantas en activo crecimiento que no hayan sido sometidas a ningún tipo de estrés (Martino, 1995).

El glifosato es el único herbicida que actúa inhibiendo la enzima 3-enolpiruvil-siquimato-5-fosfato sintetasa (EPSPS), localizada en el cloroplasto, perteneciente a la ruta del ácido siquímico (siquimato) (Della Cioppa *et al.*, 1986) lo que produce elevadas acumulaciones de ácido siquímico y sus derivados. Reddy y colaboradores (2008) detectaron mayores tenores de ácido siquímico acumulado en soja no resistente al glifosato que en soja resistente al glifosato.

El ácido siquímico es un biomarcador fisiológico sensible muy utilizado para la toxicidad del glifosato (Petersen *et al.*, 2007).

La inhibición de la enzima EPSPS, impide la síntesis del ácido corísmico (corismato) el cual se requiere para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano). La soja transgénica fue creada por una integración estable de un transgen de *Agrobacterium spp* que codifica la EPSPS resistente, manteniendo de esta manera niveles normales de aminoácidos aromáticos. Cabe resaltar que la ruta del ácido siquímico es un proceso que solo ocurre en plantas, bacterias y hongos y no existe en animales, por lo que la toxicidad aguda en animales es baja (Busse *et al.*, 2001). Dicha vía es ubicuista en los microorganismos (Bentley, 1990), varios de los cuales juegan roles importantes en el ciclo de los nutrientes (Robert *et al.*, 1998).

Estos aminoácidos esenciales son utilizados para la síntesis de proteínas y de algunos productos secundarios como son: promotores e inhibidores del crecimiento, compuestos fenólicos y lignina (Franz *et al.*, 1997). Por ejemplo, la fenilalanina es un conocido precursor de varios compuestos involucrados en la resistencia a enfermedades, como son la lignina, los flavonoides, coumarinas, taninos y fitoalexinas (Coggins, 1989; Johal *et al.*, 1984) (**Fig.2**).

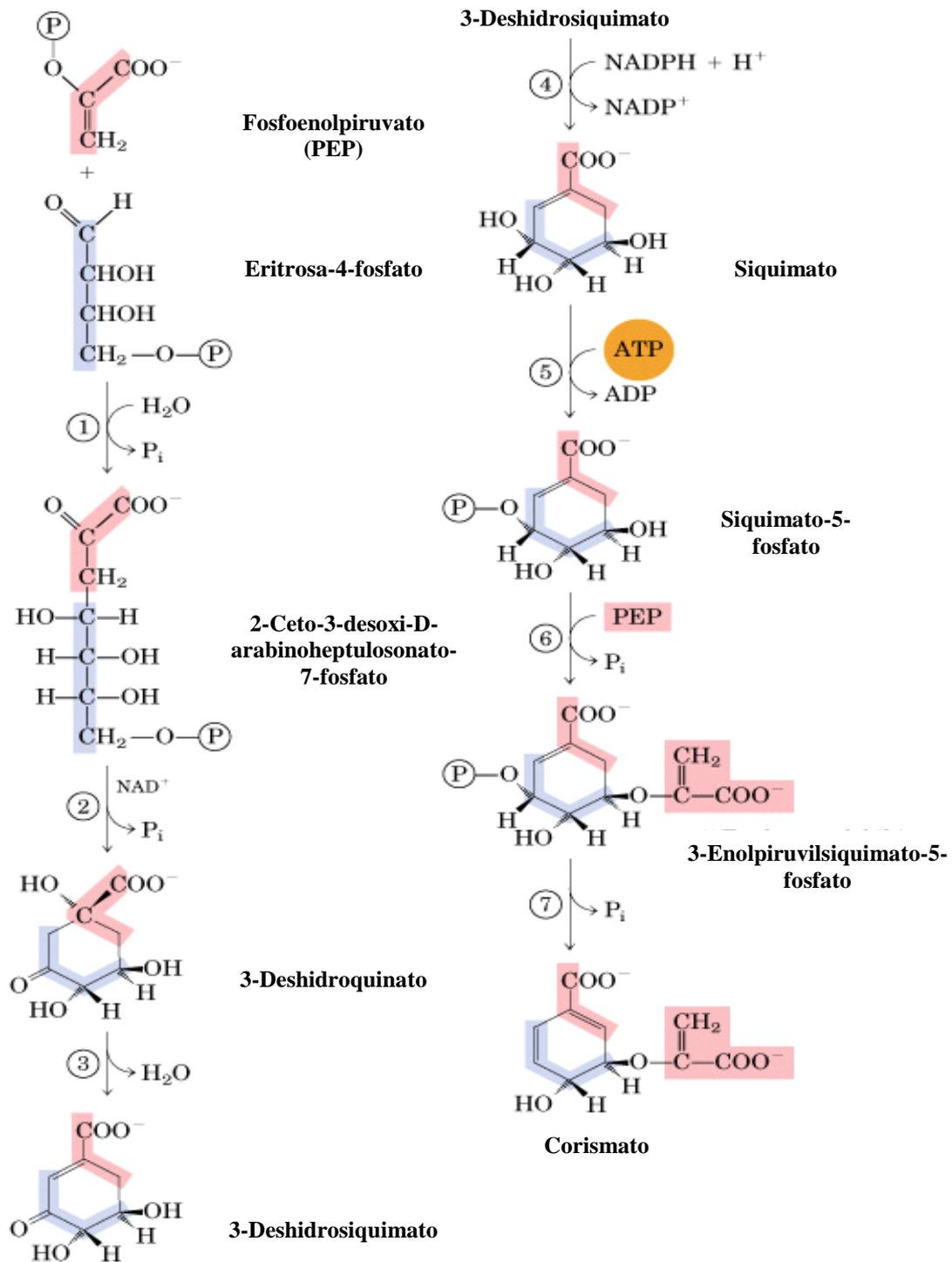


Figura 2. Síntesis del corismato, un intermedio clave en la síntesis de los aminoácidos aromáticos: triptófano, fenilalanina y tirosina (Nelson *et al.*, 2005)

Su lento modo de acción permite el movimiento del herbicida dentro de la planta antes que aparezcan los síntomas (Vencill, 2002) que incluyen el amarillamiento de los meristemas, necrosis y muerte en días o semanas (Borjesson *et al.*, 2000).

A pesar que la soja transgénica es resistente al glifosato, la aplicación del glifosato a la soja RR puede resultar en daños bajo ciertas condiciones y con ciertas formulaciones. El glifosato puede disminuir el contenido de clorofila, el crecimiento de la planta, la biomasa de los nódulos, el contenido de leg-hemoglobina, la fijación biológica del N₂ y la acumulación en la soja RR. Los síntomas visibles de los daños durante el tratamiento con glifosato incluyen manchas foliares, necrosis y clorosis. Estos síntomas se desarrollan 1-2 horas o días luego del tratamiento con glifosato y con el tiempo la soja RR se recupera del daño. Las manchas y necrosis pueden deberse a las sales, surfactantes y otros ingredientes de las formulaciones del glifosato (Borjesson *et al.*, 2000).

Estudios realizados previamente reportaron efectos perjudiciales de las aplicaciones de glifosato en el status de micronutrientes y en particular en la nutrición del Mn cuando el glifosato en dosis sub-letales, tomó contacto con las plantas no-blanco a través de la contaminación debido a la deriva (Eker *et al.*, 2006), vía rizósfera transferido desde las malezas objetivo (Neumann *et al.*, 2006), o incluso en soja transgénica (Jolley y Jansen, 2004). Como los micronutrientes como el Mn y el Zn son importantes cofactores fisiológicos para los mecanismos de resistencia de las plantas a las enfermedades (Thompson y Huber, 2007), el efecto del glifosato en el status de micronutrientes puede estar asociado a mayor susceptibilidad de las plantas a las enfermedades (ej. *Fusarium*, *Corynespora*, *Rhizoctonia*, *Gaeumannomyces* y nemátodos patógenos) (Huber *et al.*, 2005, Fernandez *et al.*, 2005).

Existe escasa información acerca de la degradación del glifosato a AMPA en las plantas. Se presume que el glifosato puede ser metabolizado por las plantas mediante dos rutas metabólicas similares a aquellas presentes en los microorganismos. Una involucra la ruptura oxidativa del enlace C-N para producir AMPA y el otro, la ruptura del enlace C-P por la liasa C-P para generar sarcosina. Este metabolito AMPA es fitotóxico a pesar que es considerablemente menos activo que el glifosato. La magnitud del daño producido en la soja RR tratada con glifosato está fuertemente relacionada a los niveles de AMPA formados en la planta. Bajo condiciones de campo, el grado de producción de AMPA depende de la dosis de glifosato, el genotipo y las condiciones edafoclimáticas (Krishna *et al.*, 2004).

1.3.2.- Comportamiento y persistencia del glifosato en el suelo.

A pesar que el glifosato no está recomendado para la aplicación directa en el suelo, una cantidad significativa puede enriquecer al mismo a través de varios mecanismos. Durante la estación temprana del crecimiento del cultivo, por aplicaciones foliares de pre-emergencia (Haney *et al.*, 2000), lavado foliar del herbicida y/o de sus metabolitos de degradación, contaminación indirecta de la deriva del producto (Ellis y Griffin, 2002), exudación radicular o muerte y descomposición de los residuos de las plantas tratadas (Laitinen, *et al.*, 2007).

Los impactos del glifosato en los organismos no blanco parecen ser insignificantes porque el glifosato es rápidamente adsorbido a las partículas del suelo donde su actividad es limitada, mientras que el glifosato libre es rápidamente degradado por los microorganismos (Dong –Mei *et al.*, 2004; Glass, 1987; Geisy *et al.*, 2000). Inicialmente los procesos de alta energía de retención explican su inactivación (Piccolo *et al.*, 1994) y la degradación por los microorganismos del suelo fue considerada una forma importante de reducción (Araujo *et al.*, 2003).

Este hecho prácticamente eliminaría el riesgo de la presencia de residuos que puedan afectar las siembras posteriores y la penetración por las raíces de los cultivos ya establecidos con las dosis recomendadas por la etiqueta. Sin embargo, su inactivación parece no ser permanente debido a que su actividad residual fue capaz de producir daños en algunas especies de plantas (Salazar y Appleby, 1982). Uno de los principales problemas son los residuos remanentes de herbicidas y en particular luego de veranos secos, debido a que la degradación de los pesticidas es más lenta en éstas condiciones pudiendo llegar a representar un riesgo de fitotoxicidad para los cultivos siguientes (Bromilow *et al.*, 1996). En situaciones de contaminación de glifosato por fuentes puntuales, derrames o repetidas aplicaciones, el resultado puede ser una acumulación del herbicida en el horizonte superior a concentraciones subletales de glifosato para las raíces de los cultivos (Eberbach, 1998). Además, varios investigadores afirman que el glifosato puede ser fácilmente desorbido en algunas clases de suelo, liberándose de las partículas y movilizándose en el mismo. En un suelo europeo, el 80% del glifosato adicionado se liberó en un período de dos horas (Piccolo *et al.*, 1994).

El glifosato puede ser translocado desde los tejidos foliares hacia las raíces y exudarse hacia el suelo (Coupland y Caseley, 1979). Diversos autores han observado la exudación del glifosato en cultivos celulares (Hetherington *et al.*, 1998).

También en experimentos en los cuales este herbicida es aplicado en las hojas, sus efectos han sido observados en las plantas adyacentes que compartían la misma zona radical (Coupland y Lutman, 1982).

Resultados semejantes fueron observados por Linder *et al.* (1964) que verificaron que algunas plantas son capaces de exudar en el suelo sustancias aplicadas vía parte aérea. Se cree que esos compuestos exudados por las plantas al suelo pueden causar efectos en la microbiota de este, provocando un mayor impacto en el ambiente aquellos biotipos que liberan una mayor cantidad de compuestos. Según Vargas *et al.*, (2005), una especie de maleza puede adquirir resistencia a los herbicidas por diversos mecanismos: absorción o translocación diferencial, metabolismo diferencial, alteración en la enzima objetivo, compartimentalización o secuestro y por presentar mayor capacidad de exudación del compuesto hacia el ambiente.

Los residuos de glifosato que provienen de las malezas tratadas representan un *pool* adicional potencial de acumulación y estabilización del herbicida en los suelos. Como en varias especies de plantas el glifosato no se metaboliza fácilmente, una considerable cantidad de residuos puede acumularse particularmente en los tejidos jóvenes (Reddy *et al.*, 2004). Sin embargo en el pasado prácticamente no se ha investigado sobre el destino del glifosato unido a los residuos de las plantas. Estudios con soja y trigo sugieren un enlace inespecífico y no-covalente del glifosato con el almidón y los componentes de las paredes celulares (Komoba, *et al.*, 1992). La unión entre el glifosato y los rastros del cultivo es marcadamente menor que con el suelo (Accinelli, *et al.*, 2005), lo que incrementa los riesgos ambientales potenciales como el escurrimiento superficial del herbicida hacia los cursos de agua (Reddy *et al.*, 2004).

Tsehaye *et al.*, (2009) reportaron que existen resultados contradictorios en la literatura con respecto a la biodisponibilidad de los residuos del glifosato en los suelos y los riesgos potenciales de intoxicación en organismos no-blanco. La investigación llevada a cabo por dichos autores tuvo como objetivo evaluar si los residuos de glifosato presentes en las malezas tratadas (rye grass perenne, *Lolium perenne L.*) o las aplicaciones directas de glifosato al suelo, producen riesgos de intoxicación en plántulas de girasol (*Helianthus annuus L.*) como cultivo siguiente. El experimento se realizó bajo condiciones de invernadero en dos tipos de suelo con propiedades contrastantes. Además se consideró el rol de diferentes períodos de tiempo entre la aplicación de glifosato al rye grass y el cultivo de girasol. En ambos suelos, el crecimiento de las plántulas de girasol y la producción de biomasa fueron fuertemente dañados por los tratamientos pre-siembra en las variantes con 0 día de espera y se recuperó dentro de un tiempo de 7 a 21 días.

Generalmente, los efectos perjudiciales fueron más pronunciados luego de la aplicación de glifosato a las malezas (90% de reducción en la biomasa) comparado con la aplicación directa al suelo (55-70% de reducción en la biomasa) con cero día de espera.

Contrariamente al manejo del glifosato recomendado en los tratamientos pre-siembra, que permite frecuentemente la aplicación del herbicida incluso hasta los primeros días luego de la siembra (Monsanto, información del producto Roundup Ultramax), los resultados de este estudio resaltan la importancia del “*tiempo de espera*” (tiempo entre la aplicación de glifosato en la maleza y la siembra del cultivo posterior), para evitar o minimizar los efectos perjudiciales en el cultivo siguiente. El análisis de la acumulación intracelular de shikimato o del status de micronutrientes revelan el riesgo de los efectos tóxicos inducidos por los tratamientos pre-siembra del glifosato, que se incrementa con la disminución del tiempo de espera y puede persistir por encima de 3 semanas, incluso cuando dejan de visualizarse claramente los efectos en el crecimiento de las plántulas y en el desarrollo.

Doublet (2009), sostiene que los pesticidas pueden ser interceptados y absorbidos por las malezas y/o los cultivos dando lugar a la presencia de residuos en las plantas que pueden enriquecer el suelo durante el ciclo del cultivo o luego de la cosecha. La mineralización es el principal mecanismo de disipación del herbicida glifosato en el suelo. Sin embargo, existe escasa información sobre los procesos de mineralización en el estrato formado por los rastrojos en sistemas de no laboreo. Dicho autor observó que la absorción del herbicida en la colza (leguminosa) retrasó su posterior degradación en el suelo y la persistencia del glifosato fue incrementada de dos a seis veces. La mineralización del glifosato contenido en el vegetal fue menor que la mineralización del herbicida presente en el suelo. El principal metabolito acumulado en las hojas fue AMPA. La mineralización del glifosato estuvo afectada por el órgano de la planta en el cual el herbicida fue incorporado, determinando la disponibilidad del herbicida y su biodegradación. Estas modificaciones del herbicida en el suelo debido a la intercepción por las plantas deben ser consideradas en las evaluaciones de los riesgos ambientales.

Rampoldi, *et al.*, (2008) señalan que la siembra directa introduce un componente extra en el análisis de la performance del glifosato que es la presencia de los rastrojos sobre el suelo, donde el glifosato puede permanecer por períodos de tiempo variables. La investigación fue realizada en el Laboratorio de Suelo del Instituto Nacional de la Investigación Agronómica, en Francia (2008). Para evaluar el efecto de la edad de los residuos del cultivo, fueron colectadas muestras de soja inmediatamente luego de la cosecha (Soja 1) y 4 meses después (Soja 2). Los residuos de maíz fueron colectados tres meses luego de la cosecha.

Se observó que la tasa de mineralización del glifosato en los rastrojos de soja y maíz dependía del tipo, la edad de los rastrojos y de la temperatura existente durante su degradación. La mineralización media del glifosato en el rastrojo de soja luego de 56 días de incubación a 15 y 28°C fue de 3,9% y 9,9% respectivamente del C₁₄ aplicado inicialmente. En los rastrojos del cultivo de maíz, los porcentajes fueron 2,0 y 3,0%, a 15 y 28°C respectivamente. La mayor mineralización del glifosato fue detectada en rastrojos jóvenes de soja (menor relación C/N), sugiriendo que las aplicaciones en los rastrojos más viejos pueden incrementar la persistencia del glifosato en sistemas de no laboreo. Los resultados mostraron que la mineralización del glifosato estuvo afectada por la temperatura de incubación y por el tipo y edad de los residuos del cultivo. Una evolución similar fue detectada en la actividad microbiana total. Fue corroborada la naturaleza de la mineralización del glifosato por cometabolismo y se observó una relación inversa entre la C/N de los rastrojos y la mineralización del glifosato.

Accinelli *et al.*, (2005) observaron que el glifosato es ampliamente utilizado como un herbicida en pre-plantación en una gran cantidad de cultivos. Dichos sistemas presentan cantidades significantes de residuos de cultivos sobre el suelo, y consecuentemente el glifosato es aplicado a la matriz del suelo en presencia de una elevada cantidad de rastrojos parcialmente descompuestos. La incorporación de los rastrojos del cultivo de maíz en un rango de 0,5 a 4% causó diferentes efectos en la mineralización y la adsorción del glifosato en suelos arenosos y suelos arenoso-francos. Más específicamente, bajos niveles de rastrojos incorporados no producen efectos o estimulan levemente la mineralización del herbicida en estos dos suelos, respectivamente. La incorporación de rastrojos de maíz resultan en la adición de un sustrato rápidamente metabolizable incrementando los procesos de degradación cometabólica del xenobiótico. En el suelo arenoso, la incorporación de un 4% de rastrojo de maíz causó un decrecimiento en la mineralización del glifosato, posiblemente por causa de una excesiva alteración de la relación C/N. La adsorción del glifosato en ambos tipos de suelo se redujo en muestras que recibieron elevadas cantidades de rastrojos incorporados. Este hecho podría ser explicado por la cobertura de los sitios de adsorción del suelo por los rastrojos del maíz.

El glifosato es un herbicida bipolar, fácilmente ionizable en solución acuosa y se comporta como un ácido débil (Martino, 1995; Prata, *et al.*, 2000). Los estudios realizados en relación a la interacción del glifosato con los constituyentes del suelo, indican que el herbicida se inactiva rápidamente debido a su adsorción al suelo y no a una degradación química o biológica (Sprankle *et al.*, 1975).

Se han sugerido varios mecanismos de unión, en la adsorción de este herbicida, como ser enlaces electrostáticos en medios extremadamente ácidos (Miles *et al.*, 1988), puentes de hidrógeno con las sustancias húmicas (Piccolo *et al.*, 1996) y especialmente, enlaces covalentes con los óxidos de hierro y aluminio (Piccolo *et al.*, 1994; Prata *et al.*, 2003) (**Fig. 3**).

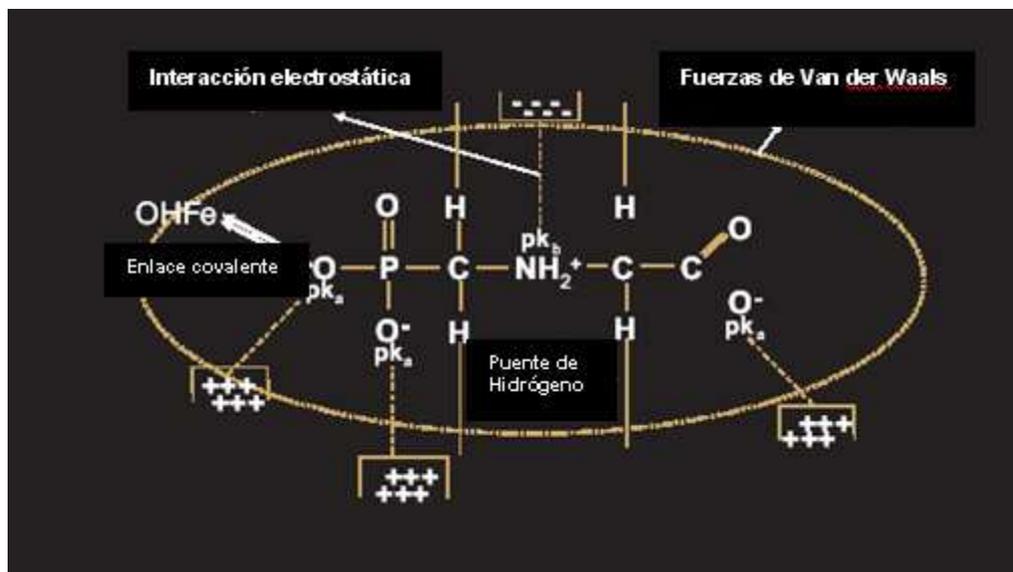


Figura 3- Esquema de los mecanismos (interacción electrostática, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y enlace covalente) involucrados en la adsorción de glifosato en el suelo (Prata *et al.*, 2003).

Tsui y Chu (2008), investigaron el impacto del Roundup utilizado para el control de malezas en la Reserva Natural de humedales subtropicales de Mai Po (Hong Kong), en organismos no blanco. Dichos autores concluyeron que el glifosato en la columna de agua fue removido por tres mecanismos: primeramente el glifosato fue rápidamente transportado por la corriente de agua, detectándose grandes cantidades del herbicida en aquellas zonas que no recibieron aplicación del producto. En segundo lugar, el glifosato fue degradado en AMPA y/o otros metabolitos intermediarios según la disponibilidad de microorganismos específicos descomponedores. En tercer lugar, el glifosato fue inmediatamente unido a los sedimentos presentes en el fondo de las aguas luego de la aplicación. La presencia de cationes fuertemente quelatantes (ej. Cu y Fe) pueden prolongar la vida media del herbicida en el ambiente debido a la formación de complejos metálicos con el herbicida los cuales reducen significativamente la disponibilidad del glifosato a la descomposición microbiana (Tsui *et al.*, 2005). Este hecho resulta en un aumento de la vida media del glifosato en el sistema. Además la vegetación acuática retiene y libera glifosato luego de un largo período de tiempo.

Dichos autores encontraron que el glifosato se comportó como un herbicida efectivo en el control de varios tipos de malezas acuáticas en la Reserva Natural de de Mai Po, un humedal subtropical de importancia internacional. Se recomiendan otros estudios para la evaluación de los impactos subletales e indirectos de este control de malezas en este valioso ecosistema incluyendo las especies no-blancas como son los anfibios (Relyea, 2005) debido a las altas concentraciones (aunque transitorias) del glifosato (y posiblemente de POEA) detectadas en algunas muestras de agua y sedimentos en el presente estudio.

La adsorción de los pesticidas en el suelo juega un rol fundamental en su destino debido a que este hecho condiciona su presencia en la solución del suelo y por lo tanto su disponibilidad para una posible degradación microbiana y/o disipación en el ambiente. (Al Rabaj y Schiavon, 2005). El glifosato es adsorbido fuertemente a las partículas del suelo (Martino, 1995; Prata, *et al.*, 2000). Una importante proporción de investigaciones desarrollada en herbicidas viene utilizando, de forma estandarizada, concentraciones del producto en base a una incorporación en los primeros 15 cm del suelo para aquellos herbicidas sujetos a una fuerte adsorción, los cuales la incorporación difícilmente ocurra más allá de los *primeros milímetros del suelo*. La estandarización lleva a *importantes subestimaciones de los posibles efectos en la microbiota* (Haney *et al.*, 2000).

La adsorción del glifosato por el suelo ha sido estudiada por primera vez por Spankle *et al.*, (1975) que demostraron que el C₁₄ del glifosato se adsorbe más fácilmente en un suelo arcillo-limoso que en un suelo arcillo-arenoso. Las diferentes características físico-químicas de los suelos juegan un rol esencial en la adsorción del herbicida. En particular su pH y su tenor de Fe, Al, Ca, P₂O₅ y materia orgánica (sobre todo en los suelos pobres en óxidos) (Maqueda *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2004). A pesar de su elevada solubilidad (10,5 g.l⁻¹), la adsorción del glifosato es muy importante. Esta fuerte adsorción se opone a su degradación que es esencialmente de naturaleza biológica y puede dar lugar a persistencias relativamente largas (Braja y Alfonso, 2005). Sin embargo, su persistencia depende de la adsorción pero también de las condiciones ambientales presentes (precipitaciones, temperatura, actividad microbiana, etc).

Al Rabaj y Schiavon (2005), realizaron un estudio sobre la adsorción del glifosato en 3 suelos agrícolas representativos de una región francesa: un suelo limo-arcilloso, pH: 6,3, un suelo arcillo-limoso, pH: 7,9 y un suelo areno-limoso, pH: 5,1. Dichos autores encontraron que el incremento del pH de los suelos provoca una fuerte reducción de la adsorción del glifosato. El suelo con el pH más elevado (7,9) presentó la menor adsorción del glifosato a pesar de su alto tenor de arcillas, materia orgánica, Ca y Fe.

Además dicha adsorción es más débil que en los otros dos suelos. En relación a los procesos de desorción del herbicida, el suelo con mayor pH presentó una más fácil desorción que los demás debido a la intervención del Ca como puente catiónico predominante conduciendo a interacciones de más débil energía que aquellas obtenidas con Fe y Al.

Al-Rajab *et al.*, (2008) evaluaron la adsorción, desorción y lavado del glifosato en tres suelos imperturbados durante 11 meses. De este estudio surgió que el glifosato fue débilmente desorbido, entre el 5 y 24% del glifosato adsorbido inicialmente. La adsorción y la desorción fue pH dependiente. Aproximadamente el 70% del glifosato inicial estuvo presente en la forma no-extractable al inicio del experimento. Contrariamente, solamente menos del 20% del glifosato inicial estuvo presente en el suelo en la forma no-extractable luego de 11 meses. Este hecho sugirió que los residuos no-extractables se convirtieron en disponibles y participaron en la biodegradación y el lavado.

Actualmente, varios autores sostienen que la materia orgánica del suelo no se correlaciona con la adsorción del glifosato en los suelos debido a que la misma compite con el glifosato por los sitios de adsorción en los minerales arcillosos y los óxidos de Fe y Al que adsorben al glifosato fuertemente (Gerrisse *et al.*, 1996). El grado de adsorción del glifosato con las sustancias húmicas puede ser variable según la estructura molecular (propiedades químicas y físico-químicas) y del tamaño molecular. Sin embargo, Albers y colaboradores (2009) encontraron que 80 días luego de la aplicación del glifosato, el 40% del glifosato aplicado se asoció con las fracciones de ácidos fúlvicos y húmicos en el suelo arenoso, mientras que solamente un 10% con los minerales arcillosos. Dichos autores concluyeron que el glifosato es adsorbido a las sustancias húmicas del suelo pareciendo ser más fácilmente desorbido que en el suelo con óxidos de Fe y Al.

En una investigación realizada por Yu y Zhou (2005) se encontró que los posibles mecanismos de adsorción del glifosato con la superficie de la materia orgánica con cargas variables es la formación de grupos de unión glifosato-metales. Tres uniones del glifosato muy peculiares: amina-N, carboxilato-O y fosfonato-O, se combinan sucesivamente con iones metálicos divalentes y trivalentes (actuando como una combinación de puente) mediante la cual la adsorción del herbicida es favorecida (Mc Bride, 1991).

Según Alletto *et al.*, (2008), bajo condiciones de laboreo conservacionista, la variabilidad en la degradación de los herbicidas se debió principalmente a la distribución vertical de la materia orgánica del suelo.

Algunos estudios han mostrado que el laboreo y la profundidad afectan las características de la materia orgánica y consecuentemente su reactividad en la adsorción del herbicida (Ding, *et al.*, 2002). Bajo manejo conservacionista, la fracción más reactiva de la materia orgánica para la adsorción del herbicida fue localizada en la zona superior del suelo y se debió a la elevada fracción de carbono alifático, mientras que con la profundidad, la materia orgánica es menos reactiva debido al alto grado de humificación dando lugar a una menor retención del herbicida.

También, ha sido determinado que la adsorción depende del contenido y tipo de arcillas del suelo (Glass, 1987; Miles *et al.*, 1988; Schuette, 1998), del pH de la solución, de la composición iónica de la superficie de la arcilla (McConnell *et al.*, 1985) y especialmente, de la concentración de glifosato en la solución (Gerritse *et al.*, 1996). Según Glass (1987), las arcillas montmorillonita y la illita adsorben más fuertemente el glifosato que la caolinita. Por tanto, la persistencia del glifosato varía entre menos de un mes hasta años (Cox, 1995; Dinham, 1998; Haney *et al.*, 1999), con una vida media entre 44 y 60 días (Kollman *et al.*, 1995). Smith *et al.*, (1991) realizaron aplicaciones anuales de herbicidas 2,4-D (durante 41 años) y MCPA (durante 35 años) en primavera en parcelas de trigo en un suelo negro Chernozem en Canadá encontraron la tasa de degradación determinada en ensayos de laboratorio, fue incrementada en el suelo de las parcelas que recibían herbicidas indicando la existencia de una adaptación microbológica y además no registraron residuos de los herbicidas en el suelo medidos un año y medio luego de las aplicaciones.

Por otra parte, cabe resaltar que el grado de enlace del glifosato es proporcional a la capacidad del suelo de adsorber fosfato inorgánico (Sprankle *et al.*, 1975; Hance, 1976; Glass, 1987; Prata, *et al.*, 2003), lo que sugiere la importancia de los enlaces covalentes entre el grupo metilfosfórico y los metales (Al^{3+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} y Mg^{2+}) en los óxidos del suelo. Prata *et al.*, (2003), concluyeron que el glifosato compite con el fósforo por sitios de adsorción específicos, pero esa competencia se produce solamente cuando los niveles de fósforo son muy elevados en el suelo, lo que no se da en condiciones de campo en la agricultura. Dichos autores detectaron una mayor desorción del glifosato en presencia de elevados niveles de fósforo en el suelo y un mayor pH. Según Simonsen *et al.*, (2008), las fertilizaciones fosfatadas incrementan significativamente el riesgo lavado de los residuos de glifosato y AMPA desde el suelo hacia los cuerpos de agua. Prata *et al.*, (2003), concluyeron que el glifosato compite con el fósforo por sitios específicos de adsorción en el suelo, pero su competencia solamente se vuelve importante cuando los niveles de fósforo presentan valores muy altos.

1.3.2.1.- Degradación microbiana del glifosato en el suelo.

La descomposición de los herbicidas ocurre a través de procesos fotoquímicos, químicos y biológicos. Por otro lado, estudios de campo y en condiciones de luz artificial indican que la fotodegradación del glifosato en suelo es insignificante. La radiación ultravioleta es el componente activo en la descomposición fotoquímica, y ocurre en la atmósfera, en la superficie de las hojas y en la superficie del suelo. (CICOPLAFEST, 1998). (**Anexo 4**).

Las transformaciones químicas en el suelo incluyen procesos de hidrólisis y oxidación. También son posibles las reacciones con los radicales libres. El glifosato puede presentar una lenta degradación química, pero no es el mecanismo principal de degradación de este herbicida. Según algunos autores, el herbicida no experimenta hidrólisis química (Torstensson, 1985).

La descomposición biológica se considera generalmente como el proceso más importante en la remoción de la mayor parte de los herbicidas por los microorganismos (Franz *et al.*, 1997; Torstensson, 1985). El herbicida es inactivado y biodegradado por los microorganismos del suelo con tasas de degradación relacionadas con la actividad microbiana en el suelo y los factores que afectan esta actividad (Eriksson, 1975). La vida media del glifosato, depende principalmente de la actividad microbiana y no de la descomposición química o fotodescomposición (Carlise and Trevors, 1988). Si bien el AMPA es también degradado en suelo, su degradación es generalmente más lenta que la del glifosato debido a que su adsorción a partículas de suelo posiblemente es más fuerte que con el glifosato y/o por la menor posibilidad de penetrar las paredes celulares o las membranas de los microorganismos del suelo (USDA, 1984). La capacidad de metabolizar el glifosato es ubicuista en el ambiente (Obojska *et al.*, 2002). Sorensen *et al.*, (2006), en un estudio realizado en dos suelos daneses, encontraron que el glifosato transportado rápidamente mediante un flujo preferencial por las fracturas del suelo, se mineralizó en los horizontes más profundos de un suelo Avedore (suelo arcilloso) sin historia previa de glifosato y por lo tanto sin adaptación microbiana al metabolismo del glifosato. La falta de mineralización del glifosato en los horizontes inferiores de un suelo Fladerne Baek (suelo arenoso) encontrada por dichos autores se debió a la fuerte adsorción del herbicida a los componentes del suelo y más específicamente a la fracción resistente a la desorción que se encuentra indisponible para los microorganismos degradativos (Zaranyika y Nyandoro, 2003).

El proceso de degradación biológica es realizado bajo condiciones aerobias y anaerobias por la microflora del suelo (Torstensson, 1985).

Los metabolitos primarios y predominantes de la degradación microbiana en suelo son glioxilato y ácido aminometilfosfórico (AMPA) que eventualmente se degrada a agua, dióxido de carbono, amonio y fosfato (Rueppel *et al.*, 1977).

El glifosato presenta una persistencia moderada en el suelo y es degradado predominantemente por un proceso microbiano *cometabólico*. (Strange-Hansen *et al.*, 2004; Accinelli *et al.*, 2005).

La *mineralización*, o biodegradación completa de una molécula orgánica en agua y suelo es, en la mayor parte de las veces, consecuencia de la actividad microbiana. Pocos mecanismos abióticos de importancia en la naturaleza convierten totalmente compuestos orgánicos con cierto grado de complejidad a productos inorgánicos, y el metabolismo microbiano de varias clases de compuestos sintéticos está caracterizado por la mineralización. Como consecuencia, la mineralización es típicamente un proceso ligado al crecimiento. La detoxificación es una consecuencia común de la mineralización excepto cuando uno de sus productos es peligroso para el ambiente, como es el caso del nitrato en ciertas aguas o el sulfuro bajo condiciones anaerobias (Alexander, 1981).

Según Alexander (1981), los microorganismos exhiben dos estrategias diferentes para la metabolización de los herbicidas que son el *catabolismo* y el *cometabolismo*. En el *catabolismo* el herbicida adsorbido es degradado en moléculas menores generando energía. Consecuentemente el número y la biomasa microbiana aumenta a costa del sustrato y este disminuye en forma considerable. En el *cometabolismo*, el pesticida es transformado por reacciones metabólicas pero no sirve como fuente de energía para los microorganismos. Por lo tanto es necesario un sustrato secundario biodegradable como fuente de carbono y energía. Las poblaciones responsables de la transformación no se incrementan en número o biomasa como resultado de la introducción del químico en el agua o suelo. Esta ausencia del crecimiento es un reflejo de la incapacidad de los organismos de utilizar los compuestos químicos para la biosíntesis y es marcadamente contrastante con el aumento del tamaño de la población o biomasa cuando un sustrato mineralizable es introducido en el mismo ambiente. Como las poblaciones que actúan en algunos químicos sintéticos son normalmente pequeñas, el compuesto sujeto al cometabolismo se caracteriza por modificarse lentamente, y la tasa no se incrementa con el tiempo, en contraste con el sustrato en el cual actúa la mineralización. En el cometabolismo se asume que la población bacteriana se encuentra en un estado estacionario debido a la constante disponibilidad de pequeñas cantidades de sustrato para el crecimiento.

Por otro lado, los productos estructuralmente similares al químico original se acumulan debido a que los organismos responsables no presentan la suficiente variedad de enzimas para dar lugar a la transformación completa, en particular como intermediario en las secuencias metabólicas normales. Normalmente no ocurre la transformación completa de la molécula herbicida. Estos pequeños cambios en la molécula, frecuentemente no resultan en la detoxificación porque no fueron lo suficientemente grandes como para eliminar las características estructurales asociadas con la toxicidad hacia una o varias especies.

La degradación microbiana está fuertemente influenciada por la solubilidad en agua presente en los compuestos. Los compuestos con baja solubilidad en agua tienden a ser más resistentes a la degradación microbiana que aquellos de alta solubilidad. Los químicos que presentan baja solubilidad en agua no pueden proveer suficiente carbono para mantener el crecimiento microbiano. Bajas concentraciones ambientales del sustrato pueden resultar en una disminución en la tasa de penetración dentro de la célula y además pocas moléculas por unidad de tiempo para permitir suficiente energía para que el organismo se pueda mantener (Alexander, 1981). Para mineralizar o crecer en sustratos que tienen baja solubilidad en agua, los microorganismos requieren algunas adaptaciones fisiológicas. La modificación de la superficie celular puede incrementar su afinidad por las sustancias hidrofóbicas y por lo tanto facilita su absorción (Nerufeld *et al.*, 1980, citado por Douglas *et al.*, 1991). Los organismos pueden crecer solamente a expensas de los compuestos disueltos en la solución. Por lo tanto la solubilidad en agua gobierna su degradación (Stucki y Alexander, 1987, citado por Douglas, *et al.*, 1991). Según Andrea *et al.*, (2003) los residuos de C₁₄ de glifosato no-extractable, es de liberación lenta debido a su dependencia del ataque microbiano en la fracción del suelo.

Ghassemi *et al.*, (1981) concluyeron que en general la tasa de degradación del glifosato en el agua es más lenta que en el suelo porque existe menor cantidad de microorganismos en el agua que en la mayoría de los suelos (**Fig.4**).

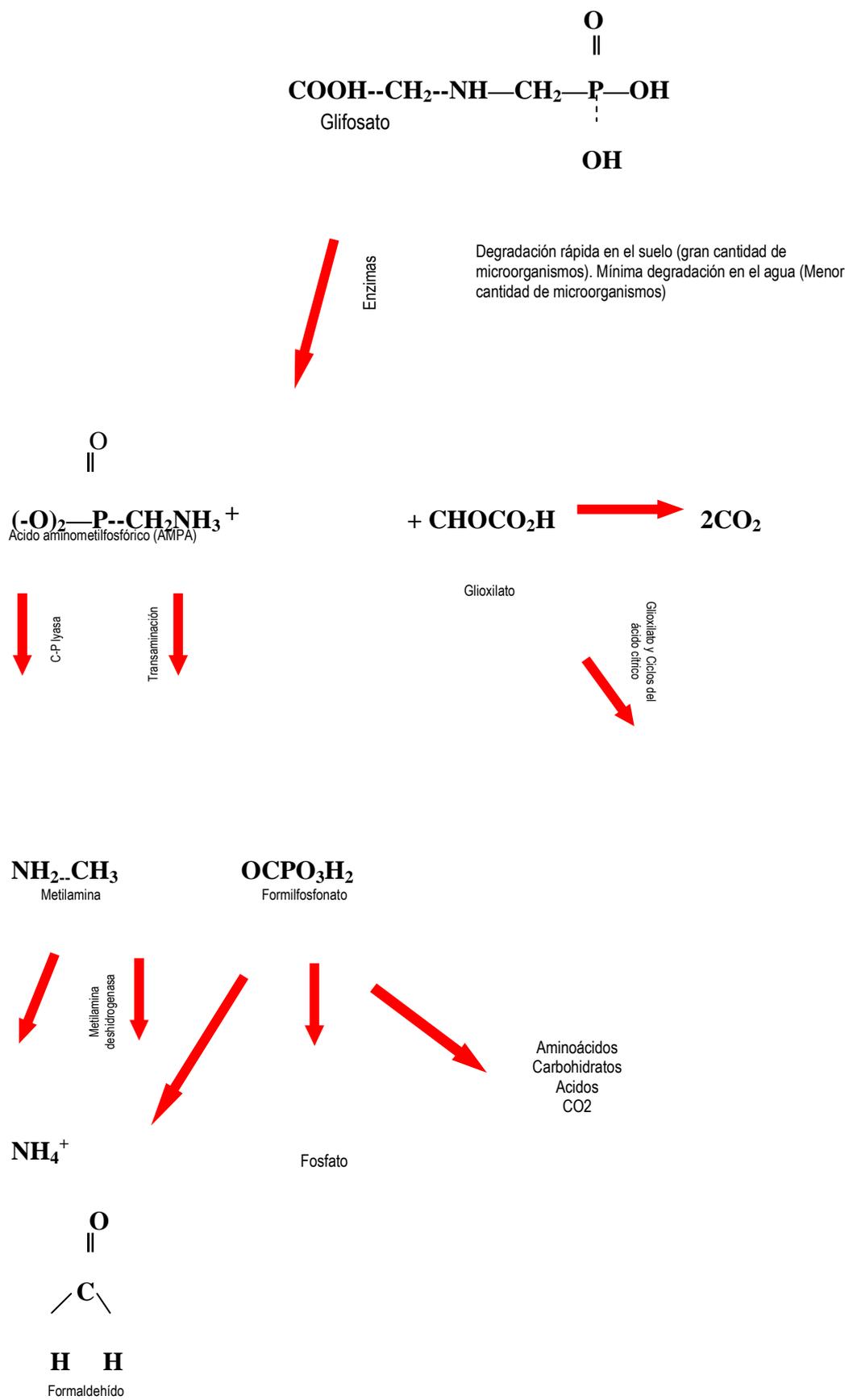


Figura 4. Metabolitos primarios y predominantes de la degradación microbiana en suelo: glioxilato y ácido aminometilfosfórico (AMPA). (Schuette, 1998).

Otra vía de degradación es a través de *Pseudomonas* PG2982 las que metabolizan el glifosato a glicina, carbono y fosfato. Las cepas de *Pseudomonas* son aerobias facultativas y algunas pueden utilizar los nitratos como aceptores finales de electrones. Su rendimiento energético es respiratorio, nunca fermentativo o fotosintético. En dicha ruta se produce la ruptura del enlace carbono-fósforo (C-P) dando lugar a la sarcosina que se oxida a glicina y formaldehído (Kishore *et al.*, 1987). El glifosato es un organofosforado, caracterizado por la presencia de un enlace covalente y estable (C-P); bacterias muy específicas parecen ser responsables de su degradación (Dick y Quinn, 1995). La ruptura del enlace C-P puede estar dado por un rango de enzimas como son la C-P liasa, y varias hidrolasas. Muchos microorganismos aislados de varios de ambientes metabolizan fosfonatos, principalmente por la acción de la enzima liasa C-P de amplio espectro de sustrato. (Obojsa *et al.* 1999).

Si bien la tasa de degradación por microorganismos del suelo es rápida y completa, ésta varía considerablemente con el tipo de suelo y los microorganismos presentes (Shuette, 1998) (**Fig.5**).

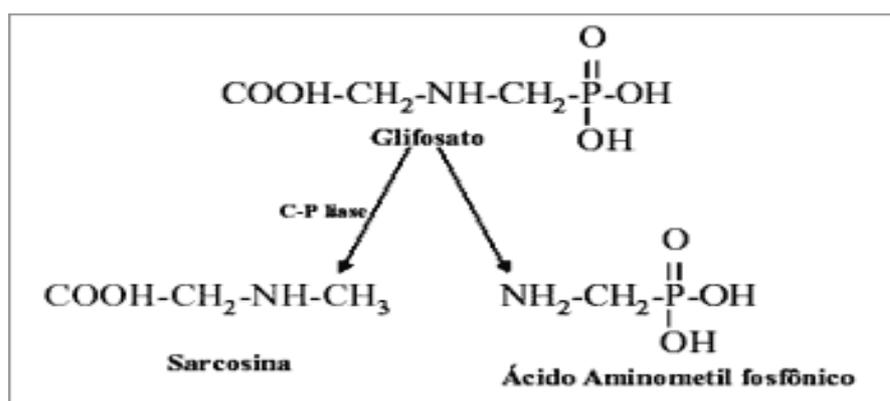


Figura 5- Degradación del glifosato por bacterias del suelo, con producción de los metabolitos ácido aminometilfosfónico (AMPA) y sarcosina (Dick *et al.*, 1995).

Varias investigaciones han comprobado que el grupo de las *Pseudomonas* está presente en el 50% de los recuentos en placa en suelos tratados con altas dosis de glifosato, exhibiendo una extensa diversidad metabólica y presentando el rol principal en la degradación del glifosato. (Ratcliff *et al.*, 2006). Gomsing *et al* (2004), encontraron una alta correlación entre la tasa de mineralización del glifosato y los recuentos de *Pseudomonas spp* en 5 suelos daneses.

1.3.3.- Efectos del glifosato sobre los microorganismos del suelo

1.3.3.1. - Efectos positivos o neutros en los microorganismos del suelo

Carlise y Trevors (1986) demostraron que el glifosato puede estimular o inhibir los microorganismos del suelo dependiendo de la concentración del herbicida utilizada. Wardle y Parkinson (1990) y Hart y Brookes (1996) no observaron efectos en la biomasa microbiana y en la actividad. Las dosis de glifosato aplicadas en el ensayo fueron probablemente muy bajas para detectar los efectos mediante los métodos empleados.

En investigaciones realizadas a campo, el glifosato no afecta o produce una leve estimulación de los microorganismos del suelo. En tal sentido, se observaron incrementos en el número de bacterias y hongos (Rueppel *et al.*, 1977; Roslycky, 1982; Haney, 1999), en la respiración del suelo (Carlisle *et al.*, 1986; Haney *et al.*, 2000 ; Araújo *et al.*, 2003; Fernandez, 2007), en la mineralización del C y del N (Muller *et al.*, 1981; Haney, 1999; Haney *et al.*, 2000; Andrea *et al.*, 2003) y en algunas actividades enzimáticas (Gianfreda *et al.*, 1995; Araújo *et al.*, 2003, Fernández, 2007). Según Haney (1999) y Araújo (2003) inmediatamente después de la aplicación del glifosato se estimula la actividad microbiana del suelo, que lo degrada rápidamente, aún en presencia de altas dosis aplicadas sin afectar adversamente la actividad microbiana.

En un estudio realizado por Zabaloy (2008), se seleccionaron tres suelos de la Pampa Argentina sometidos a repetidas aplicaciones de glifosato. Los suelos fueron un Petrocalcic Paleustol, un Typic Argiudoll y un Typic Haplaustoll, los cuales se obtuvieron de parcelas con laboreo reducido. La aplicación de glifosato en una dosis diez veces mayor a la recomendada por hectarea, dio lugar a efectos de corto plazo en algunas actividades enzimáticas (respiración inducida por el sustrato, FDA y actividad deshidrogenasa). En general, se observaron incrementos de las bacterias heterótrofas aerobias, la respiración inducida por el sustrato dentro de la primera semana luego de la aplicación del glifosato. La actividad deshidrogenasa no mostró cambios consistentes debido a la aplicación del glifosato, mientras que la FDA tuvo una reducción del 14% en su actividad enzimática en las parcelas tratadas vs los controles a los 7 días de la aplicación del herbicida.

Gomez, *et al.*, (2009), evaluaron el efecto de dosis crecientes de glifosato en la biomasa y la actividad metabólica y en el cociente metabólico de la microbiota del suelo bajo condiciones controladas. Se aplicó una formulación comercial de glifosato (48%), en un suelo Vertic Argiudoll (Argentina), ubicado en bandejas, en dosis de 0,48, 0,96, 1,92 y 3,84 l ia/ha. Las dosis usualmente aplicadas en el campo son entre 0,96 y 1,92 l ia/ha. Los tratados y el control fueron incubados a 25°C y 75% de capacidad de campo. Luego de 4 y 45 días de la aplicación del glifosato, fueron determinados: la biomasa microbiana, respiración microbiana, cociente metabólico (qCO_2) y la actividad deshidrogenasa. La biomasa microbiana al día 4 de la incubación no difirió significativamente entre el control y las dosis de 0,48 y 0,96 l, mientras que fue significativamente menor en las mayores dosis. Luego de 45 días la biomasa microbiana, en la dosis de 3,84 l fue significativamente menor que el control. La respiración mostró diferencias significativas durante el período de tiempo, pero no entre dosis. Se encontraron diferencias significativas en el qCO_2 entre dosis en los dos períodos de incubación. La actividad deshidrogenasa fue significativamente mayor en los tratamientos con glifosato que en el control al inicio de la incubación. Las variables analizadas mostraron un efecto inicial inhibitorio que afectó las células microbianas. Sin embargo este efecto fue temporal en dosis equivalentes o mayores que las dosis utilizadas en el campo.

Andrea *et al.*, 2003, encontraron diferencias significativas en la actividad deshidrogenasa enseguida de realizada la segunda aplicación de glifosato, mostrando que el herbicida puede estimular los procesos oxidativos del suelo, sin embargo dos meses luego de la aplicación de glifosato, no se detectaron diferencias significativas en la cantidad de formazán, independientemente del número de aplicaciones (1, 2, 3 y 4), demostrando que el efecto del herbicida en la actividad enzimática es transitorio, lo que fue demostrado también para otros pesticidas. Parece ser que el glifosato o sus productos de degradación prácticamente no afectaron la actividad de esta enzima en el suelo estudiado. Sannino y Gianfreda (2001) detectaron diferentes respuestas de varias enzimas de diferentes suelos tratados con glifosato.

Feng *et al.*, (1990) también detectaron una rápida degradación inicial del glifosato seguida de una más lenta, lo que se atribuyó a la acción inicial de los microorganismos sobre el glifosato libre y posterior ataque del herbicida adsorbido en el suelo. Dado que los herbicidas con una relación C/N < 15 (C/N del glifosato es de 3/1) presentan la potencialidad de mineralizarse fácilmente y que los microorganismos heterótrofos requieren C y N para su sobrevivencia y crecimiento, el glifosato puede ser el responsable del incremento inmediato de la actividad microbiana del suelo (Haney, 1999).

Las aplicaciones del glifosato incrementan la mineralización neta, la nitrificación y las pérdidas potenciales de nitratos debido a la reducción de la inmovilización del N por los microorganismos incrementando los riesgos de contaminación de las aguas subterráneas en suelos sometidos a la agricultura (Frazier *et al.*, 1990).

1.3.3.2.- Efectos negativos sobre los microorganismos del suelo

Krzysko-Lupicka *et al.* (1997) sostienen que la *abundancia y diversidad* de los microorganismos son extremadamente importantes en los procesos metabólicos del suelo (descomposición de la materia orgánica) y contribuyen a su fertilidad (Bromilow *et al.*, 1996).

Dichos autores señalan que el glifosato, utilizado como única fuente de C o P, inhibe la población de los hongos del suelo y cambia la composición de cepas, actuando por lo tanto como un agente ambiental de selección.

Según Busse *et al.*, (2001) las bacterias y los hongos cultivados disminuyeron en número o fueron eliminados cuando se aislaron del suelo y crecieron en un medio de cultivo sólido conteniendo glifosato, siendo los hongos particularmente sensibles. La toxicidad en los medios artificiales es previsible por la naturaleza del glifosato, clasificado como un compuesto antimicrobiano. Solamente un número limitado de especies de bacterias y hongos son capaces de crecer cuando el glifosato es adicionado como única fuente de P en los medios de cultivo (Dick y Quinn, 1995). Contrariamente a los resultados en el laboratorio, la mayoría de los estudios han mostrado o que no afecta o una leve estimulación de los microorganismos por el glifosato. Otros estudios han encontrado similares reducciones en la población contada cuando se adicionó glifosato al medio de cultivo (Christy *et al.*, 1981; Quinn *et al.*, 1988; Krzysko-Lupicka y Orlick, 1997) siendo necesaria la suplementación de aminoácidos aromáticos para sostener la síntesis de proteínas y superar la inhibición de la ruta del ácido siquímico (Quinn *et al.*, 1988).

Se han registrado numerosos efectos negativos sobre los microorganismos en estudios de laboratorio (Krzysko *et al.*, 1977; Christy *et al.*, 1981; Quinn *et al.*, 1988) y no cuando el herbicida fue adicionado al suelo (Busse, 2001). Las discrepancias entre los estudios de laboratorio y campo se explican parcialmente por las concentraciones elevadas e irreales de glifosato utilizadas en los medios de cultivo y además por la disminución de la biodisponibilidad en el suelo debido a la adsorción a las arcillas y a los óxidos de Fe y Al (Busse, 2001).

El glifosato es un compuesto polar conocido por su fuerte adsorción con los óxidos de Fe y Al y la arcilla (Piccolo *et al.*, 1994). Sin embargo su disponibilidad es ilimitada en los medios artificiales; las uniones a las partículas de suelo y los complejos metálicos reducen el *pool* de glifosato lábil y como consecuencia la tasa de absorción por los microorganismos. Esto explica la causa de mayores riegos para las comunidades microbianas luego de la aplicación del herbicida en suelos con baja capacidad de adsorción (Gianfreda *et al.*, 1995; Rueppel *et al.*, 1977).

Según Ractiliff (2006), existen escasos conocimientos acerca de los efectos del glifosato sobre la *estructura de la comunidad microbiana del suelo* definida como la abundancia y proporción de los distintos grupos funcionales o filogenéticos. En un estudio en un suelo forestal arcilloso y otro arenoso en Estados Unidos, resultó en ausencia de cambios en la estructura de la comunidad del suelo 1, 3, 7, y 30 días luego de la aplicación del Roundup a dosis de campo recomendadas. Por otro lado, las elevadas concentraciones de Roundup simulando un derrame concentrado del producto en el suelo (100 veces mayores a la dosis de campo recomendada), alteraron sustancialmente varios índices de la estructura de la comunidad dentro de la primera semana de la aplicación, siendo estos cambios de corto plazo. El primer efecto de las altas concentraciones fue el cambio en la relación biomasa bacteria/ hongo. Se encontraron grandes incrementos en los recuentos y la biomasa de bacterias en ambos suelos, mientras se detectaron pequeños cambios en los hongos del suelo (hifas, propágulos, biomasa). Este cambio en la estructura de la comunidad refleja el concepto generalizado que sostiene que las bacterias son favorecidas cuando los sustratos lábiles son introducidos, mientras los hongos son favorecidos cuando dominan en el C del suelo los sustratos complejos como es la lignina. Las bacterias dominantes en los suelos son más comunes en aquellos suelos sometidos a agricultura intensiva y sistemas de pastura expuestos a repetidas aplicaciones de fertilizantes o materia orgánica (Bittman *et al.*, 2005). Según Ractiliff *et al.*, (2006), los efectos del glifosato son dosis dependientes y altamente transitorios pudiendo ser explicados por el rápido enriquecimiento de las bacterias oportunistas que utilizan los compuestos como fuente de nutrientes y/o de carbono. De esta investigación se concluye que las aplicaciones a dosis de campo o dosis mayores del glifosato no afectan o presentan un pequeño efecto en las comunidades microbianas del suelo en plantaciones de pino.

Andrea, *et al.* (2003) evaluaron el efecto de sucesivas aplicaciones de glifosato en los microorganismos del suelo y su disipación. Se colectaron muestras a una profundidad de 0-15 cm de un suelo Ultisol de Brasil de un área sin historia de aplicaciones del herbicida. Los valores de CO₂ detectados dos meses luego de dos, tres y cuatro aplicaciones de glifosato, fueron estadísticamente menores que luego de una aplicación, quedando evidente que las poblaciones microbianas del suelo fueron realmente afectadas. La tendencia decreciente en las cantidades mineralizadas, así como el aumento de la vida media del glifosato con el número de aplicaciones, mostró que las repetidas aplicaciones pueden resultar en una gradual dificultad en el metabolismo de la molécula en el suelo. Probablemente, el intervalo de tiempo reducido entre las repetidas aplicaciones de glifosato (15 días) no permitió la selección de microorganismos capaces de sobrevivir en presencia del herbicida. Douglas *et al.*, (1991) indicaron que la mineralización de varios compuestos orgánicos por los microorganismos del suelo es a menudo precedida por un período de aclimatación, intervalo de tiempo durante el cual no se detecta la biodegradación. El tiempo de aclimatación requerido por una población microbiana para degradar un químico está influenciado por la tasa y frecuencia de exposición a dicho químico. Elevadas o bajas concentraciones del químico puede incrementar este tiempo. El proceso de adaptación puede involucrar uno o la combinación de: 1) inducción o depresión de enzimas específicas para las vías de degradación de un compuesto particular; 2) una mutación aleatoria en la cual se producen nuevas capacidades metabólicas permitiendo la degradación que no era posible previamente ó 3) un incremento en el número de organismos en la población degradativa.

Araújo *et al.*, (2003) realizaron estudios in vitro para evaluar el efecto del glifosato en dos suelos Hapludult y Hapludox de Brasil en un área sin historia de glifosato y otras dos áreas con 6 y 11 años de aplicaciones del herbicida y observaron una mayor producción de dióxido de carbono y en la FDA en suelos tratados con glifosato que aquellos suelos sin historia de aplicaciones del herbicida. Los suelos que han estado expuestos a al glifosato durante varios años tuvieron la más alta respuesta en la actividad microbiana. En este caso, las aplicaciones pudieron haber seleccionado las poblaciones microbianas capaces de utilizar el herbicida.

Tejada (2009) concluyó que la aplicación del glifosato en mezcla con el diflufenican (herbicida pre y pos emergente utilizado en el control selectivo de malezas de hoja ancha), en dos tipos de suelo en España, uno arcilloso y otro arenoso en condiciones de laboratorio, incrementó la persistencia individual de cada herbicida e incrementó los efectos tóxicos de ambos herbicidas en la actividad biológica del suelo. Las actividades biológicas determinadas fueron el C de la biomasa microbiana, las actividades fosfatasa alcalina, ureasa, beta glucosidasa, arylsulfatasa y deshidrogenasa.

Según Powell, *et al.*, (2009), el glifosato puede acumularse y permanecer activo en las raíces de las plantas o ser exudado en la rizósfera, donde puede afectar la colonización de las raíces por microorganismos simbióticos. Algunas leguminosas, incluida la soja, hospedan hongos micorrízicos arbusculares y rhizobium simultáneamente y forman una simbiosis tripartita que produce efectos sinérgicos en el establecimiento y el funcionamiento de cada simbiosis. Por lo tanto, es posible pensar que el efecto del glifosato en una simbiosis podría también afectar indirectamente las demás simbiosis (Chalk *et al.*, 2006). El glifosato aplicado a dosis de campo recomendadas no produjo efectos ni en la colonización de las raíces de la soja por el hongo micorrízico *Glomus intraradices* o *Bradyrhizobium japonicum* ni en los tejidos foliares de la soja *Bradyrhizobium japonicum*, que realiza fijación simbiótica de nitrógeno con el cultivo de soja, posee la enzima EPSPS sensible al glifosato y frente a la exposición del herbicida acumulan grandes concentraciones de shikimato y ciertos ácidos benzoicos que pueden ser inhibidores del crecimiento de la planta (Mooeman *et al.*, 1992). Estos efectos están acompañados por la inhibición del crecimiento y/o la muerte de la bacteria, dependiendo de la concentración de glifosato. Este estudio sugirió que el glifosato pudo haber producido efectos en el metabolismo del nitrógeno en la soja transgénica. Además, el glifosato es translocado preferentemente a los nódulos de la soja. Algunos efectos como son la reducción de la nodulación, el tamaño de los nódulos, el contenido de leghemoglobina en los nódulos pueden ser causados por las aplicaciones de glifosato en la soja transgénica (Redddy y Zablutowicz, 2003). Sin embargo, los efectos del glifosato en la actividad nitrogenasa en los nódulos de la soja transgénica en estudios de campo fueron inconsistentes. Estudios realizados en invernáculo indicaron que los efectos adversos pueden ser máximos bajo condiciones de stress de humedad. La sensibilidad de las cepas de *B. japonicum* variaron. En el campo, los efectos fueron transitorios y no hubo evidencias que fuera afectado el rendimiento del cultivo.

Kremer *et al.*, (2005) encontraron que los exudados radiculares de la soja transgénica tratada con glifosato contenía concentraciones del herbicida mayores a 100 ng por planta y cerca del doble del contenido de aminoácidos que las plantas no tratadas 16 días luego del tratamiento. El contenido de carbohidratos en los exudados radiculares luego del tratamiento con glifosato fue el doble en la soja transgénica que en la soja no transgénica. Ensayos in vitro, mostraron que los exudados radiculares de la soja transgénica tratada con glifosato estimularon el crecimiento de hongos y bacterias en la rizósfera (*Fusarium spp.* y *Pseudomonas spp.*) que pudieron afectar adversamente el crecimiento de las plantas y los procesos biológicos del suelo y la rizósfera. En *Fusarium spp.*, el crecimiento microbiano fue generalmente mayor en los exudados radiculares de soja transgénica con tratamiento de glifosato que en exudados radiculares de soja no transgénica tratada o no tratada con glifosato. Estos resultados pudieron predecir que existen más problemas con *Fusarium spp.* en soja transgénica vs soja no transgénica.

2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS

2.1.- Objetivos generales

- ♣ Evaluar los efectos de repetidas aplicaciones de glifosato sobre variables microbiológicas del suelo, en un suelo Brunosol Eutrico Típico con cultivo de soja en agricultura continua en siembra directa en la zona norte del país.
- ♣ Determinar la vida media del glifosato y ácido aminometilfosfórico (AMPA) en un suelo Brunosol Eutrico Típico con cultivo de soja en agricultura continua en siembra directa en la zona norte del país.

2.2.- Objetivos específicos

- ♣ Comparar la actividad respiratoria, la biomasa microbiana y ciertos índices derivados de estas determinaciones como el cociente de mineralización del carbono orgánico (qM), el coeficiente microbiológico ($qMic$) y el cociente metabólico (qCO_2), en parcelas control y en las tratadas con el herbicida en varios momentos, con la finalidad de determinar la incidencia del herbicida en parámetros microbiológicos del suelo.
- ♣ Comparar los niveles de actividad de la fosfatasa ácida, alcalina, hidrólisis del FDA y las actividades enzimáticas relativas (actividad enzimática por unidad de carbono de la biomasa) en los tratamientos, al inicio del experimento y a cosecha, con el objetivo de determinar el efecto de las aplicaciones del herbicida sobre estas variables.
- ♣ Determinar las curvas de disipación del glifosato y AMPA en suelo bajo un sistema de agricultura continua en siembra directa y relacionarlas con las variables microbiológicas estudiadas.
- ♣ Relacionar el efecto del contenido hídrico y la temperatura del suelo sobre la degradación del glifosato y AMPA y sobre las variables microbiológicas estudiadas.

3.- HIPOTESIS DE TRABAJO

♣ **Hipótesis 1:** Dado que el glifosato inhibe la ruta del ácido siquímico y por ende la biosíntesis de los aminoácidos esenciales, siendo esta ruta ubicuista en los microorganismos y considerando un sistema de agricultura continua sin laboreo, se infiere que las aplicaciones sucesivas de dicho herbicida durante 13 años pudieron haber generado una presión de selección sobre los microorganismos del suelo favoreciendo aquellos capaces de utilizar el glifosato como nutriente. Se espera entonces un incremento en los valores de las variables microbiológicas al aumentar el número de aplicaciones.

Predicción: los valores de las variables microbiológicas debieran ser mayores en las parcelas tratadas con glifosato respecto a las parcelas control.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Caracterización del área de estudio

Se trabajó en ensayos de soja de primera dentro de un sistema de agricultura continua en siembra directa, instalados desde hace 13 años en la Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC) ubicada a 10 km de Paysandú, Uruguay (32° 21´ S y 58° 02`W). La zona es sub-húmeda con una temperatura media anual de 17 °C y con una precipitación anual de 1100 mm. El suelo corresponde a un *Brunosol Eutríco Típico* (Argiudol Típico) de la Unidad de Suelo San Manuel, con textura limo-arcillosa con 29g 100g⁻¹ de arcilla, 44g 100g⁻¹ de limo, y 27g100g⁻¹ de arena en los primeros 20cm, con pH 5.5, C orgánico 19,2 g kg⁻¹. En la **Tabla 1** se detallan las propiedades físico-químicas del suelo de las parcelas correspondientes al ensayo.

Tabla 1: Propiedades físicas y físico-químicas del suelo *Brunosol Eutrico Típico* (Unidad de Suelo San Manuel) de las parcelas correspondientes al ensayo. Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay, 2006.

Promedio de Microporosidad ó Capacidad de campo (C.C.)	Promedio de Macroporos	Promedio de Porosidad total	Promedio de conductividad hidráulica (ks) (mm/hs)	Densidad Aparente (g.cm-3)	pH		%	ppm	Meq/100g	Meq/100g	Meq/100g	Meq/100g
					H ₂ O	KCl						
0,365	0,159	0,525	51,23	1, 3	5.5	4.7	3.3	9	0.88	9.7	1.3	0.07

En la **Tabla 2** se detalla la secuencia de cultivos entre los años 1993-2006 en las parcelas correspondientes al ensayo. Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay.

Año	Invierno	Verano
1993	Cebada	Sorgo
1994	Trigo	Girasol
1995	Trigo	Sorgo
1996	Barbecho	Maíz
1997	Avena	Soja
1998	Barbecho	Maíz
1999	Trigo	Barbecho
2000	Trigo	Soja
2001	Barbecho	Girasol
2002	Trigo	Soja
2003	Barbecho	Girasol
2004	Cebada	Soja
2005	Trigo	Soja
2006	Barbecho	Soja

4.2.- Diseño experimental

El diseño experimental correspondió a parcelas completamente al azar. Las unidades experimentales incluyeron 10 parcelas de 4m x 1,5m, correspondientes a 2 tratamientos y 5 repeticiones. Los tratamientos fueron los siguientes: en *ausencia de dos aplicaciones post-siembra y de una aplicación pre-siembra (control)* y con *3 aplicaciones sucesivas: una pre siembra (23/10/06) y dos post siembra (20/11/06 y 27/12/06)*, de glifosato Ultra Max (74,7%) a razón de 1,6 l/ha (dosis media recomendada por hectarea) (**Fig. 6**). Tanto las parcelas control como las tratadas presentaron entre 3 y 4 aplicaciones anuales de glifosato durante 13 años. En cuanto al *manejo previo al ensayo*, en el año 2006 se realizaron *dos aplicaciones de glifosato*, una en el mes de abril y una segunda aplicación en el mes de octubre, antes de la siembra de la soja. En las parcelas control donde se realizó solamente una aplicación pre siembra (además de la aplicación durante el barbecho de invierno), se extrajeron las malezas con azada antes de la siembra del cultivo.

Los factores ambientales: temperatura del aire y humedad, existentes durante las aplicaciones del glifosato fueron adecuadas para la performance del tratamiento. Sin embargo, la velocidad del viento durante las tres aplicaciones y principalmente durante la primera de ellas fue mayor a la recomendada por la bibliografía (**Anexo 5**). Para amortiguar el efecto del viento se utilizó una estructura de nylon en las parcelas tratadas al momento de realizar las aplicaciones del producto. Las parcelas tratadas con glifosato representan el *manejo comercial* que se realiza normalmente en el cultivo de soja en el país.



3 aplicaciones	control	3 aplicaciones	3 aplicaciones	control
control	3 aplicaciones	3 aplicaciones	control	control

Figura 6- Diseño experimental del ensayo. Las *parcelas control* presentaron ausencia de dos aplicaciones sucesivas post- siembra y de una pre- siembra de glifosato Ultra Max a razón de 1,6 l/ha y las tratadas presentaron tres aplicaciones sucesivas del herbicida (una pre- siembra y dos post siembra). Las parcelas control y a las tratadas recibieron entre 3 y 4 aplicaciones anuales de glifosato durante 13 años. Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

4.2.1.- Características del cultivar y manejo del cultivo de soja.

El cultivar sembrado fue Don Mario 55i corresponde a un grupo V medio, de crecimiento indeterminado en el que luego de R1 continúa diferenciando nudos, y es posible que el número de nudos luego de la floración se duplique y hasta triplique; la superposición entre vegetativo y reproductivo es de un 40% o más. Florecen a partir de la porción basal del tallo principal. La **siembra** se realizó el **26 de octubre de 2006** y la **cosecha** el **2 de mayo de 2007**. La densidad fue de 250000 plantas/ha.

Presenta un ciclo con una duración aproximada entre la emergencia a la cosecha de 139 días en la zona norte del país. La duración de las etapas fenológicas para este cultivar son de 70, 35 y 31 días para las etapas S-R3, R3-R6 y R6 –R8, respectivamente. (Barraca Erro, 2006).

Considerando las aplicaciones de agroquímicos realizadas en el ensayo, es importante señalar que en el sistema de rotación agrícola de la EEMAC no se realizan aplicaciones post-siembra de glifosato, salvo situaciones específicas como son la presencia de malezas de porte alto, como *Amaranthus sp* y *Solanum sisymbriifolium* o cuando se establecen estrategias de control del reingreso de malezas por semilla. En la siguiente tabla (**Tabla 3**) se detallan las aplicaciones de agroquímicos realizadas en el ensayo durante los años 2006 y 2007.

Tabla 3. Aplicaciones de agroquímicos durante el ensayo. Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

Producto	Dosis	Fecha de aplicación
Rango 480 Cibeles (glifosato 48%)	3 l/ha	04/06 (barbecho de invierno)
Rango 480 Cibeles (glifosato 48%)	5 l/ha	10/06 (antes de la siembra de soja)
Superfosfato triple	60 kg/ha de P ₂ O ₅ (al voleo)	10/06 (al momento de la siembra de soja)
Endosulfán 35 SAUDU (Endosulfán)	0,7 l/ha	02/02/07 16/02/07 09/03/07 23/03/07
Intrepid SC (Metoxifenocida)	0,2 l/ha	10/01/07
Engeo (Cipermetrina + Thiametoxan)	0,25 l/ha	09/02/07 16/02/07 19/03/07

Los muestreos se realizaron: al inicio del experimento, inmediatamente después de la primera aplicación, a los 4, 8 y 19 de la primera aplicación, inmediatamente después de la segunda aplicación, a los 4, 10 y 27 de la segunda aplicación; inmediatamente de la tercera aplicación, a los 6, 9, 16, 30 y 60 días de la tercera aplicación y a cosecha (36 días luego de la tercera aplicación del herbicida).

En cada muestreo se tomaron 8 sub-muestras de suelo de cada parcela (muestras compuestas) a una profundidad de 7cm. con un calador de densidad aparente de 5cm de diámetro y 7cm de largo. Cada muestra se trasladó al laboratorio en bolsas de polietileno para las determinaciones microbiológicas y químicas.

En el primer caso, las muestras fueron inmediatamente secadas al aire, tamizadas con un tamiz de 2 mm y preservadas a 3-5°C hasta su análisis. Para los análisis del glifosato y AMPA, las muestras fueron preservadas a una temperatura de -20°C.

4.3 Metodología

4.3.1.- Condiciones ambientales

Se registró la **temperatura del suelo** mediante la instalación de un termómetro de registro continuo dentro del ensayo (24 lecturas por día), durante el período de estudio.

Se realizó un **balance hídrico** cada 5 días con la finalidad de determinar la disponibilidad de agua en el suelo durante el período en estudio (Thornthwaite y Mather, 1955). Los datos climáticos requeridos para la elaboración del balance hídrico fueron brindados por la Estación meteorológica del Aeropuerto Chalking ubicada en Paysandú. El balance hídrico de un suelo consiste en la cuantificación de las pérdidas y ganancias de agua que se producen en el sistema y las consecuencias que de ello se deriva en la cobertura vegetal. Los resultados que nos brinda son la evapotranspiración real, el uso y recarga del agua del almacenaje del suelo, las deficiencias y excesos (escurrimiento y drenaje) (Thornthwaite y Mather, 1955).

La ecuación utilizada para el cálculo fue la siguiente:

$$\text{Precipitación} + \text{Riego} = \text{ET} + \text{Var. Alm.} + \text{E} + \text{D}$$

Donde: ET es evapotranspiración; Var. Alm.: Variación del almacenaje en el suelo; E: escurrimiento y D: Drenaje.

Las necesidades de agua (ETm) para una producción máxima varían entre 450 y 700 mm/temporada, dependiendo del clima y de la duración del período vegetativo. Las necesidades de agua del cultivo de soja, vienen dadas por el coeficiente de cultivo (kc) en relación con la evapotranspiración de referencia (ETo), siendo los **valores de kc**: durante la etapa inicial 0,3-0,4 (20-25 días); en la etapa del desarrollo 0,7-0,8 (25 a 35 días); en la etapa de mediados de estación 1,0-1,15 (45 a 65 días), en la etapa de finales de temporada 0,7-0,8 (20 a 30 días) y en la cosecha 0,4-0,5 (Doorembos *et al.*, 1980)

Este modelo permite representar el efecto de la demanda atmosférica y la capacidad de retención de agua del suelo, en el agua disponible para las plantas, y los diferentes destinos del agua que ingresa al sistema (evapotranspiración, recarga del agua, escurrimiento y excesos).

4.3.2 Variables microbiológicas del suelo

Se determinaron: respiración microbiana (mg C-Kg^{-1} suelo seco), biomasa microbiana (mg C-Kg^{-1} suelo seco), fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, hidrólisis del acetato de fluoresceína (*FDA*) y se calcularon los índices microbiológicos: cociente de mineralización del carbono orgánico (qM)= $(\text{mg C-CO}_2\text{respiración.C-total}^{-1}).100$, coeficiente microbiológico ($qMic$)= $\text{C-biomasa microbiana como porcentaje del C orgánico total}$, cociente metabólico (qCO_2)= $\text{mg C-CO}_2.h^{-1}.\text{mg C-biomasa. h}^{-1}$ y actividades enzimáticas relativas (expresadas por unidad de carbono de la biomasa microbiana). Todas las variables fueron evaluadas en la totalidad de las parcelas (total 10) en los momentos mencionados (total 16) a excepción de las actividades enzimáticas que se determinaron solamente al inicio del experimento (antes de las 3 aplicaciones sucesivas) y a la cosecha (190 días del inicio del experimento).

Biomasa microbiana: se determinó por la técnica de fumigación-incubación de Jenkinson y Powlson, (1976); por la diferencia del flujo de C-CO_2 entre muestras fumigadas con cloroformo y reinoculadas con suelo fresco, con otras no fumigadas (Frioni, 2006).

Respiración microbiana: se evaluó el flujo de CO_2 en muestras de suelo de 50g incubadas durante 10 días, a 28°C , con un contenido de agua del 70% de la capacidad de campo (Frioni, 2006).

Fosfatasas ácidas y alcalinas: se evaluaron usando como sustrato el p-nitrofenol fosfato a dos pH y luego se determinó el p-nitrofenol liberado en espectrofotómetro a 400nm (Schinner *et al.*, 1996, Frioni, 2006).

Hidrólisis del acetato de fluoresceína (FDA): se evaluó usando el método de Alef (1998) mediante la determinación de la fluoresceína liberada a 490 nm luego de 1 hora de incubación a 24°C .

4.3.3 Concentración de glifosato y AMPA en el suelo

Se determinó la *vida media* del glifosato y AMPA en suelo y las curvas de disipación del herbicida. La determinación de las concentraciones de glifosato y AMPA en suelo se realizó en 3 *parcelas tratadas* en los siguientes momentos: 0 (al inicio del experimento), 64 (inmediatamente después de la tercera aplicación), 70, 73, 80, 94, 154 y 190 días del inicio del mismo. El momento 190 corresponde al momento de la cosecha de la soja. En estas determinaciones no serán consideradas las *parcelas control*, excepto al inicio del experimento y al momento de la cosecha.

Tres parcelas control se analizaron al inicio del experimento (momento 0) para determinar las concentraciones del glifosato y AMPA.

Los análisis para la cuantificación del glifosato y su metabolito AMPA en suelo se realizaron en la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSA) perteneciente al MGAP por HPLC con derivatización post columna (Cowell *et al.*, 1989).

El *límite de detección o de determinación* de la técnica utilizada para los análisis del glifosato y AMPA fue de 0,02 y 0,01 ppm respectivamente. El *límite de determinación* se define como la menor concentración del plaguicida analizado que es posible cuantificar con un margen de seguridad adecuado.

5. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS

Las variables evaluadas fueron analizadas según tres modelos, dependiendo de las condiciones de lectura:

1. Variables microbiológicas: respiración y biomasa microbiana medidas en forma repetida en el tiempo y los índices microbiológicos: cociente de mineralización del carbono orgánico (qM), coeficiente microbiológico (qMic) y el cociente metabólico (qCO₂).
2. Variables microbiológicas: enzimas fosfatasa ácida, alcalina y FDA fueron medidas en el inicio y al final del experimento
3. Variables: glifosato y AMPA fueron medidas en forma repetida en el tiempo.

Las *variables microbiológicas*: biomasa microbiana y respiración microbiana fueron medidas en 16 momentos del experimento: 0, 4, 8, 27, 31, 37, 64, 70, 73, 80, 94, 154 y 190 días del inicio del mismo. Las aplicaciones de glifosato se realizaron en las fechas: 0, 27 y 64 días del inicio del experimento. En ellas fue realizado un duplo muestreo, antes e inmediatamente después de cada aplicación.

La respuesta de la totalidad de las variables microbiológicas en los diferentes momentos fue analizada considerando dos criterios: en forma global y luego de la primera, segunda y tercera aplicación de glifosato. El objetivo del segundo análisis mencionado fue separar el efecto posible del herbicida medido inmediatamente después de cada aplicación, del valor de las medias de las variables microbiológicas estudiadas en todo el período experimental. Para ello, se definieron 3 períodos de estudio. El *primer, segundo y tercer período* consideraron los 3 muestreos inmediatamente posteriores a la primera aplicación del herbicida (días 0, 4 y 8), los 3 muestreos inmediatamente posteriores a la segunda aplicación (días 27, 31 y 37) y los 4 muestreos inmediatamente posteriores a la tercera aplicación (días 64, 70, 73 y 80) respectivamente.

La presencia de muestreos regulares y frecuentes permitió realizar el ajuste de funciones de regresión entre las variables estudiadas y los días post aplicación en cada período definido. Además se ajustaron rectas de regresión para el tratamiento control y el tratado con glifosato.

En la totalidad de los casos se compararon los dos tratamientos (control y tratado con glifosato) por Análisis de Varianza (ANOVA), considerando las medidas repetidas en el tiempo y se realizó la comparación de medias por el Test de Tukey (5%) cuando el resultado del análisis de medidas repetidas en el tiempo mostró diferencias estadísticamente significativas.

Los modelos planteados dependieron de las variables, según fueran medidas a través del tiempo o en un momento único en el período experimental. En el primer caso, fueron ajustadas medidas repetidas en el tiempo considerando un modelo mixto, estudiándose diferentes matrices de correlación temporal para eliminar los posibles efectos de autocorrelación entre parcelas. Se seleccionó la matriz de mejor ajuste según los criterios Akaike, Bayesiano y Máxima Verosimilitud.

Las matrices estudiadas fueron la AR (1) (autocorrelativa de primer orden), la CS (simétrica compuesta) y la UN (sin estructura). Esta última no logró convergencia con los datos del experimento, por lo que no pudo ser utilizada. La AR (1) y la CS mejoraron el análisis sin inclusión de término de autocorrelación. Debido a que la AR (1) se mostró superior, resultó la matriz de covarianza utilizada (índices de Akaike, BIC y LH menores). El modelo de parcelas divididas en el tiempo se expresó como:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + E(a) + \gamma_j + \tau\gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

y_{ijk} las observaciones de las variables relevadas

μ el efecto de la media general de la población

τ_i el efecto del i-ésimo tratamiento aplicado

γ_j el efecto de la j-ésima medición en el tiempo

$\tau\gamma_{ij}$ el efecto de la interacción entre tratamiento y tiempo

$E(a); \varepsilon_{ijk}$ los errores de tratamiento y de tiempo e interacción respectivamente.

Otra forma de modelar el comportamiento en el tiempo de las variables medidas en más de un momento, fue ajustando funciones de regresión. Para el estudio *de las variables microbiológicas* durante el período experimental se ajustaron curvas de regresión exponencial.

La determinación de las concentraciones de glifosato y AMPA en suelo se realizó en las *parcelas tratadas* en los siguientes momentos: 0 (al inicio del experimento), 64 (inmediatamente después de la tercera aplicación), 70, 73, 80, 94, 154 y 190 días del inicio del mismo. En las parcelas control se determinaron al momento 0 y a los 190 días (cosecha de soja). Con el objetivo de modelar los valores promedio *de Glifosato y AMPA* a través del tiempo, fueron graficados sus valores, intentando ajustarse funciones polinomiales y no lineales, sin suceso.

En la totalidad de los casos fue estudiado el comportamiento de los errores de los modelos ajustados, sin retirar los valores extremos encontrados. Esta decisión se debe a que no se tuvo certeza de la naturaleza del posible error cometido, y este hecho fue interpretado como un índice de la variabilidad ambiental.

Las *correlaciones lineales* entre las variables microbiológicas, las variables glifosato y AMPA y las condiciones ambientales: temperatura de suelo y agua disponible fueron determinadas luego de la tercera aplicación y en los siguientes 3 muestreos.

Se realizó un *análisis multivariado de Componentes Principales* a nivel de parcela, para relacionar el comportamiento de los tratamientos control (C) y tratado con glifosato (T) al inicio del experimento (M0), al momento de la tercera aplicación de glifosato (M9) y en los siguientes 3 muestreos (M10, M11 y M12). Dichos momentos de muestreo correspondieron a los días 0 (inicio del experimento), 64 (tercera aplicación), 70, 73 y 80 del inicio del experimento, respectivamente. Las variables consideradas en este análisis fueron: biomasa microbiana, respiración microbiana, los índices microbiológicos: qC02, qM y qMIC y el glifosato y AMPA.

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa “Statistica” v5.5, (1999).

6.- RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos en las variables microbiológicas del suelo, los índices microbiológicos, las variables glifosato y AMPA, las variables ambientales y sus correlaciones. Por último se realizó un análisis de componentes principales y se estudiaron las correlaciones lineales entre las variables que presentaron mayor relevancia en el experimento.

6.1.- Factores ambientales

6.1.1- Temperatura del suelo en las parcelas del experimento. Estación Experimental: “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

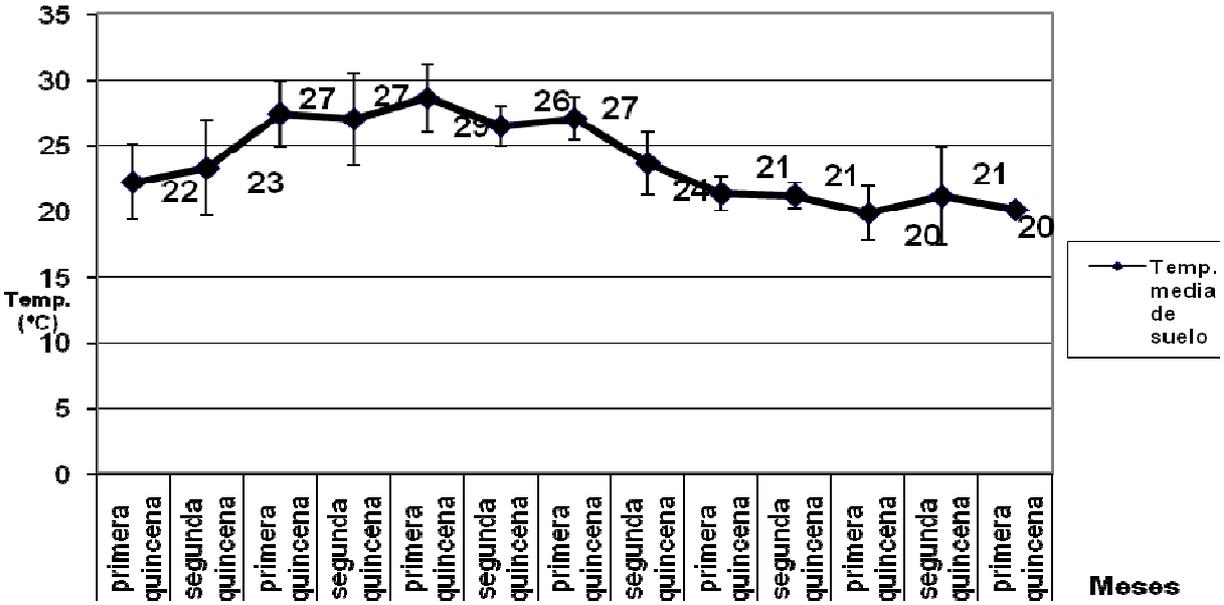


Figura 7. Temperatura media del suelo Brunosol Eutricto de la Unidad San Manuel correspondiente a las parcelas del experimento, determinada a 3cm de profundidad, durante el período noviembre de 2006- mayo de 2007. Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC). Paysandú, Uruguay.

6.1.2.- Contenido de Agua disponible en el suelo Estación Experimental: “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

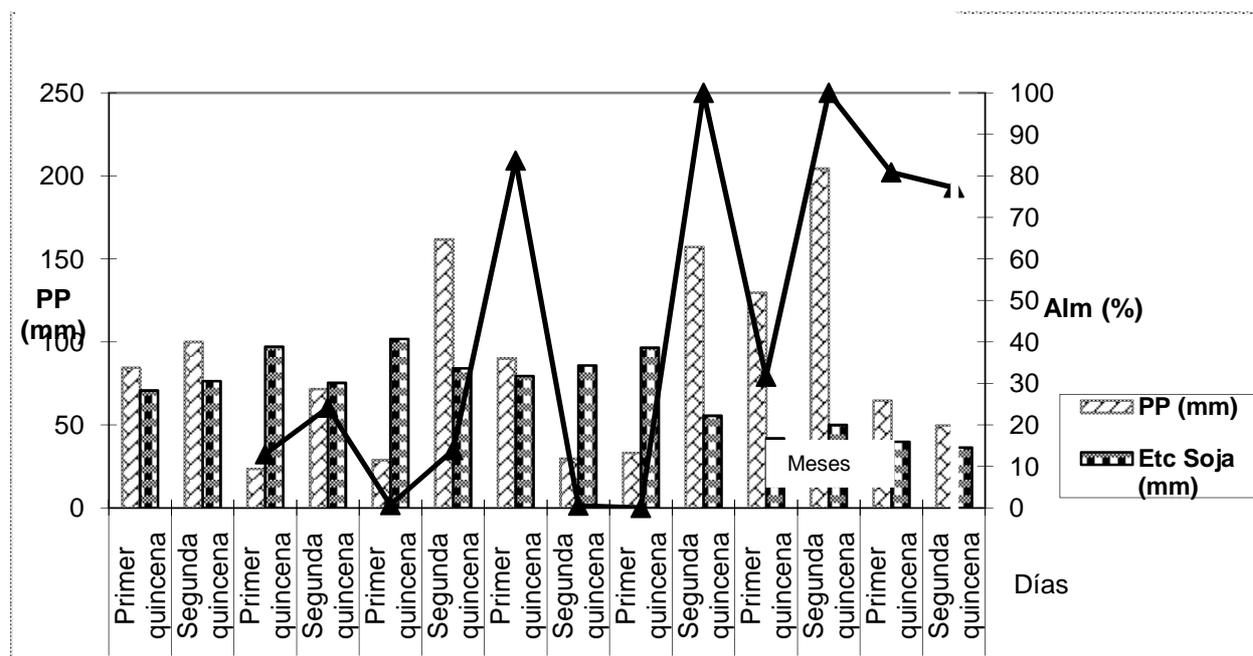


Figura 8. Agua disponible como Almacenaje (%) en los 7 cms superiores del suelo Brunosol Eutrítico de la Unidad San Manuel correspondiente a las parcelas del experimento, precipitación (pp) y evapotranspiración del cultivo de soja (ETC) durante el período: octubre de 2006- abril de 2007. Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay.

En el **Anexo 6** se presenta el balance hídrico realizado cada 5 días con la finalidad de determinar el agua disponible en los 7 cms superiores del suelo.

6.2.- Variables microbiológicas del suelo

Debido a la ausencia de diferencias significativas observadas en el duplo muestreo realizado antes e inmediatamente después de cada aplicación de glifosato realizadas los días: 0, 27 y 64 en la totalidad de las variables microbiológicas estudiadas, se consideró el valor promedio entre los valores de los tratamientos.

Análisis de la las variables microbiológicas: biomasa, respiración microbiana e índices microbiológicos: Cociente de mineralización del C orgánico (qM), Coeficiente microbiológico ($qMic$) y Cociente Metabólico (qCO_2) luego de cada aplicación de glifosato.

En cada período y para todas las variables se realizó un Análisis de Varianza considerando los efectos de los tratamientos, fechas de aplicación y la interacción entre ambos. En el presente estudio los Índices microbiológicos: qM y $qMic$ están directamente relacionados con las variables respiración y biomasa microbiana debido a que su denominador, el C orgánico total, no es variable ya que se consideró el mismo para todas las parcelas, lo que resulta en un Análisis de Varianza con igual p-valor para todos los efectos estudiados.

En el *primer período de estudio* no se detectaron diferencias significativas en las variables: *respiración microbiana* y en el *índice microbiológico qM (cociente de mineralización del C orgánico)* en los efectos promedio de la interacción entre tratamientos y momento de aplicación y los efectos entre los momentos de muestreo. Solamente se observó una tendencia en el Análisis de Varianza en los valores promedio por fecha de muestreo ($p < 0.0643$) en las dos variables microbiológicas. Estos promedios no resultaron diferentes según el test de Tukey al 5%. (**Anexos 7 y 8**).

En el *tercer período de estudio*, se detectaron diferencias significativas en la interacción entre tratamientos y fechas de muestreo en las variables: *respiración microbiana* y *qM* . En todos los momentos, la respiración microbiana y el qM fueron mayores en las parcelas control frente a las parcelas tratadas con glifosato observándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,0189$) en la *respiración microbiana* en el día 73, que corresponde a 9 días luego de la tercera aplicación de glifosato, liberando un 52,8% más de CO_2 en la respiración microbiana en el control vs el tratado, obteniendo $354 \text{ mg } CO_2 \text{ Kg}^{-1}$ suelo seco y $187 \text{ mg } CO_2 \text{ Kg}^{-1}$ de suelo seco respectivamente.

Al día 80, el tratamiento control y tratado con glifosato no mostraron diferencias significativas, indicando un efecto transitorio del herbicida en la variable medida. En relación al qM , se logró detectar diferencias significativas en los efectos promedio de los tratamientos ($p < 0,0189$) en el día 73, obteniendo un qM correspondiente a $76,5 \text{ mg C-CO}_2 \cdot \text{C-orgánico}^{-1} \cdot 100$ en el control vs $40,5 \text{ mg C-CO}_2 \cdot \text{C-orgánico}^{-1} \cdot 100$ en el tratado. Al día 80, el tratamiento control y tratado con glifosato no mostraron diferencias significativas, indicando un efecto transitorio del herbicida en la variable medida. En este período, se observaron además, tendencias ($p < 0,10$) en los efectos de tratamiento y momentos de muestreo ($p < 0,06$) en dichas variables microbiológicas (**Anexos 9, 10 y 11**). Los mayores valores de respiración microbiana promedio se obtuvieron en las parcelas control; en dichas parcelas no se detectaron diferencias significativas en los momentos de muestreo. El tratamiento con herbicida presentó diferencias significativas en los momentos 64 y 73 del inicio del experimento.

En el *tercer período de estudio*, para el caso del CO_2 acumulado en la respiración se encontró un *ajuste lineal significativo* tanto para el tratamiento control así como también en el tratado. Fueron comparados los coeficientes de regresión (β_1) de ambas rectas, no detectándose diferencias significativas entre ellos. Por lo tanto, la respuesta es lineal en ambos casos y fue ajustada una regresión general para esta variable (**Tabla 4 y Fig.9**), correspondiendo al modelo general:

$$\text{CO}_2 \text{ acum.} = \beta_0 + \beta_1 \text{ días.}$$

Tabla 4. CO_2 acumulado en la respiración microbiana. Coeficientes de regresión lineal (β_1), desvíos estándar de β_1 , ($\text{DE}(\beta_1)$), límites inferior y superior de intervalo de confianza al 95% (Li y Ls) para los β_1 , y coeficiente de determinación (R^2) para el control y el tratado con glifosato y para la recta conjunta. Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC). Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

TRATAMIENTOS	b_1	Desvío Estándar de b_1	r^2	P > F	Límite inferior	Límite superior
CONTROL	53.92	8.73	0.95	0.0252	16.36	91.48
TRATADO	42.22	2.92	0.99	0.0048	29.66	54.79
ECUACION GENERAL	48.07	5.31	0.93	0.0001	32.08	61.06

En la **Tabla 4** se observa que en el tratamiento control como en el tratado el ajuste de las rectas fue significativo. Los intervalos de confianza para los respectivos coeficientes de regresión muestran que no existen diferencias significativas entre ellos. Por este hecho, fue ajustada una única recta de regresión con todos los puntos, que resume el comportamiento del CO₂ acumulado en el período estudiado.

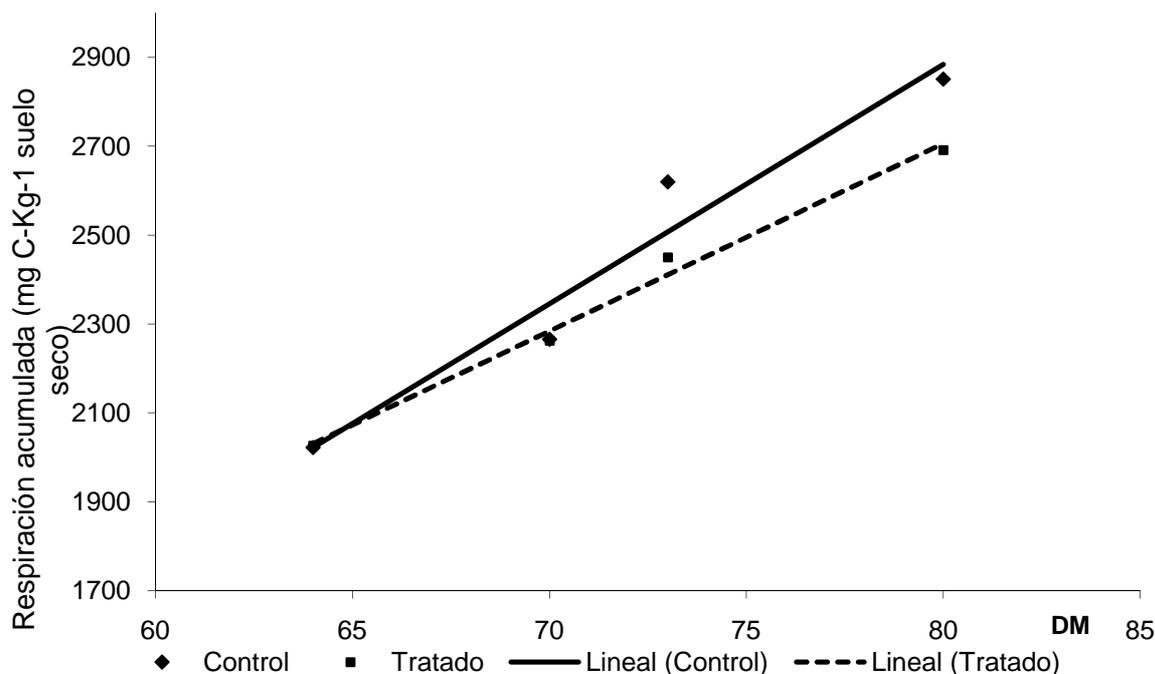


Figura 9. Valores promedio del CO₂ acumulado en la respiración microbiana en el tratamiento control (CO₂ acum = 1429 + 54 DM) y tratado con glifosato (CO₂ acum = 672 + 42 DM), a partir de la tercera aplicación del herbicida (día 64 del inicio del experimento), y hasta 16 días de aplicado (día 85 del inicio del experimento). Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC). Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

Análisis de las variables microbiológicas: biomasa, respiración microbiana e índices microbiológicos: Coeficiente microbiológico (qM), Cociente de mineralización del C orgánico ($qMic$) y Cociente Metabólico (qCO^2) en forma global.

En el estudio de las variables biomasa y respiración microbiana, los efectos promedio de los tratamientos y el efecto de la interacción entre tratamientos y momento de aplicación, no presentaron diferencias significativas ($p < 0,52$ y $p < 0,97$; $p < 0,19$ y $p < 0,24$) para biomasa y respiración microbiana respectivamente. El efecto promedio del momento de muestreo resultó estadísticamente significativo para biomasa ($p < 0,0041$) y respiración microbiana ($p < 0,0001$).

Los mayores valores de biomasa microbiana promedio: $1868 \text{ mg C-Kg}^{-1}$ suelo seco, se obtuvieron a los 190 días de inicio del experimento que se corresponde con 126 días de la tercera aplicación. Este valor fue estadísticamente significativo y superior que los obtenidos a los 0, 4, 8, 27, 37, 70, 73 y 80 días de inicio del experimento. En cuanto a la respiración microbiana se concluye que al inicio del experimento y en los dos muestreos posteriores (días 0, 4 y 8 respectivamente), se determinaron los mayores valores promedio, siendo estadísticamente diferentes de los obtenidos en los demás momentos de muestreo.

Los valores promedio correspondientes a la variable: *biomasa microbiana* en las parcelas control y tratadas y los valores de dicha variable como promedio de las parcelas control y tratadas en cada momento de muestreo, se presentan en las **Figs. 10 y 11** respectivamente.

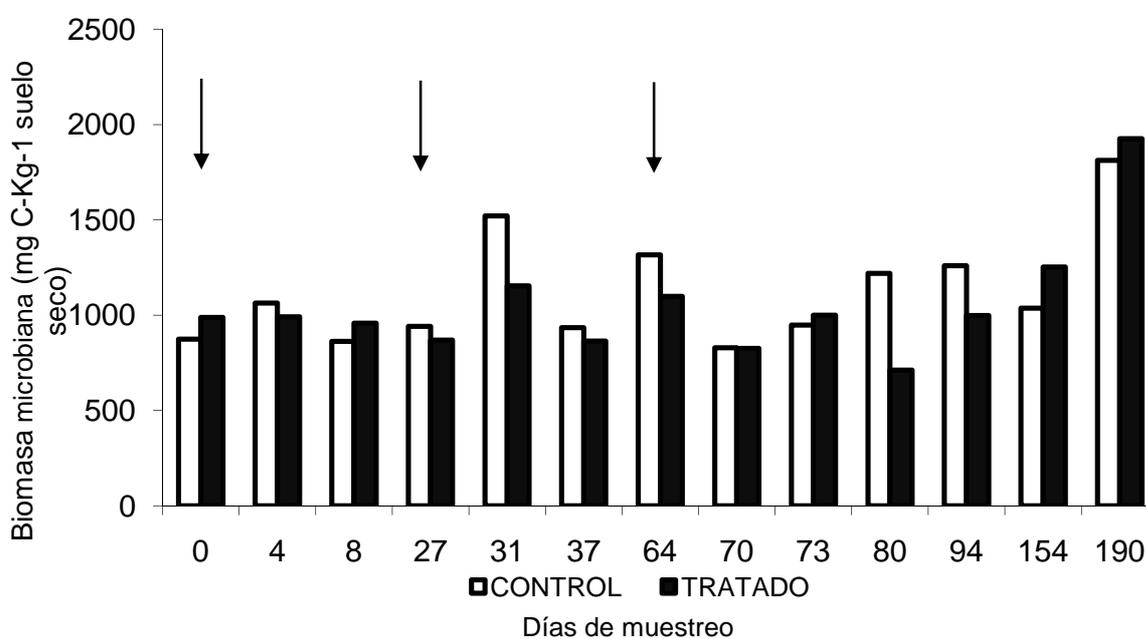


Figura 10. Valores promedio del Carbono correspondiente a la **biomasa microbiana** (mg C-Kg^{-1} suelo seco) en las parcelas control y tratadas con glifosato en los 190 días. Los días cero y 190 corresponden al primer y último muestreo (cosecha de soja) respectivamente. Las flechas indican las fechas de aplicación del herbicida (día cero, 27 y 64 del inicio del experimento). Estación Experimental “Dr. Mario. A.Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

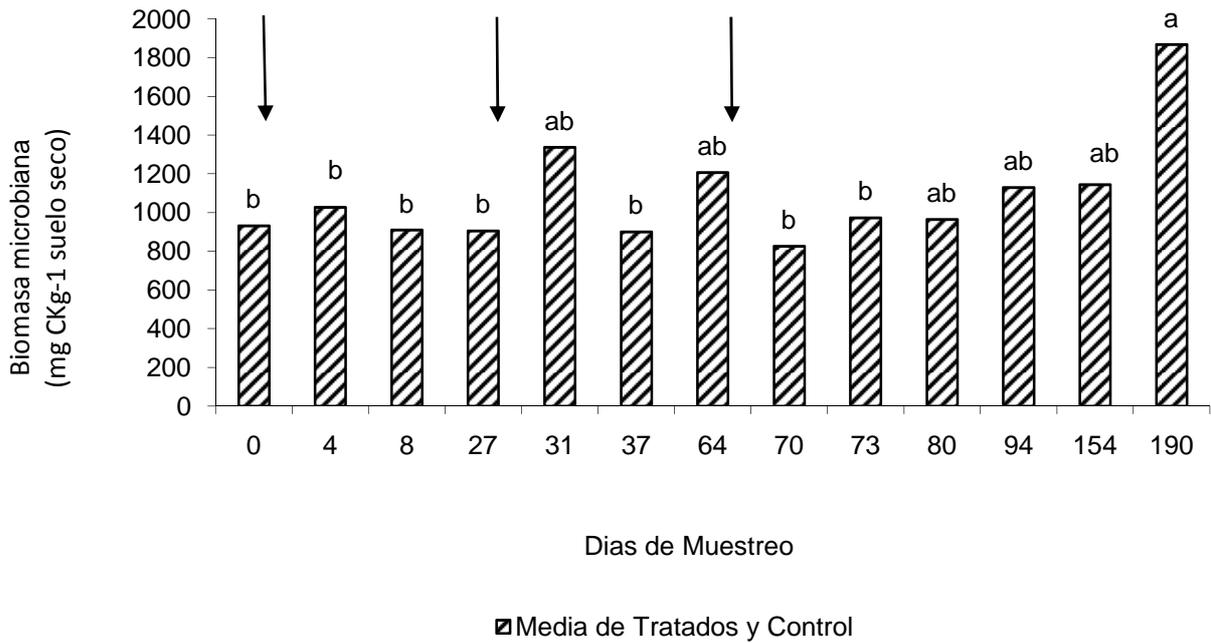


Figura 11. Valores promedio del Carbono correspondiente a la **biomasa microbiana** (mg C-Kg⁻¹ suelo seco) como promedio de las parcelas control y tratadas con glifosato en los 190 días. Los días cero y 190 corresponden al primer y último muestreo (cosecha de soja) respectivamente. Las flechas indican las fechas de aplicación del herbicida (día cero, 27 y 64 del inicio del experimento). Las letras sobre las barras indican si existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos control y tratado. Tratamientos señalados con la misma letra no difieren por Tukey al 5%. Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

Los valores promedio correspondientes a la variable: *respiración microbiana* en las parcelas control y tratadas y los valores de dicha variable como promedio de las parcelas control y tratadas en cada momento de muestreo, se presentan en las **Figs. 12 y 13** respectivamente.

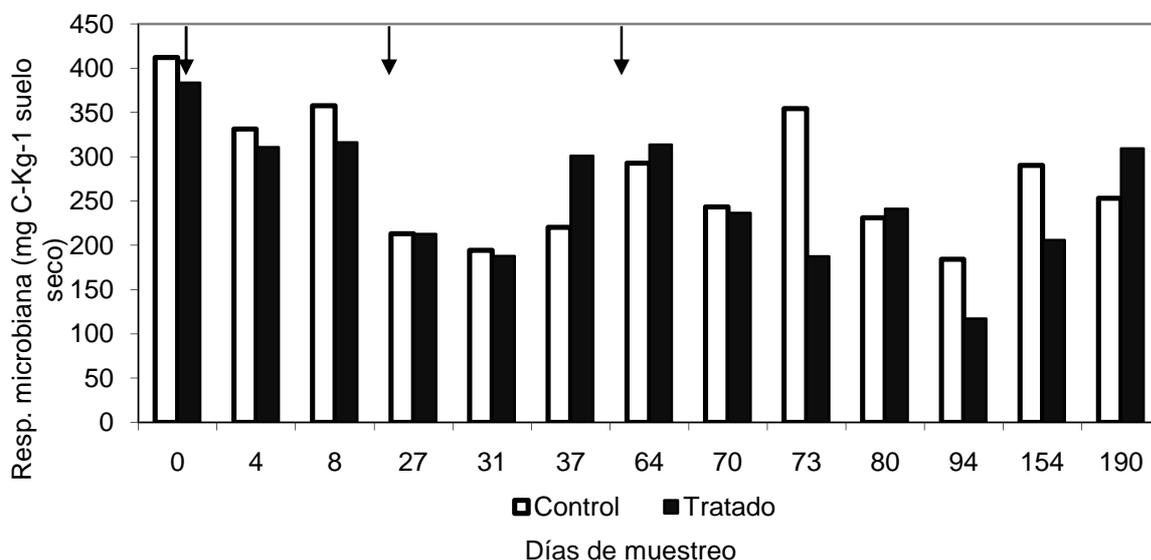


Figura 12. Valores promedio del Carbono correspondiente a la **respiración microbiana** (mg C-Kg⁻¹ suelo seco) en las parcelas control y tratadas con glifosato en los 190 días. Los días cero y 190 corresponden al primer y último muestreo (cosecha de soja) respectivamente. Las flechas indican las fechas de aplicación del herbicida (día cero, 27 y 64 del inicio del experimento). Estación Experimental “Dr. Mario. A.Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

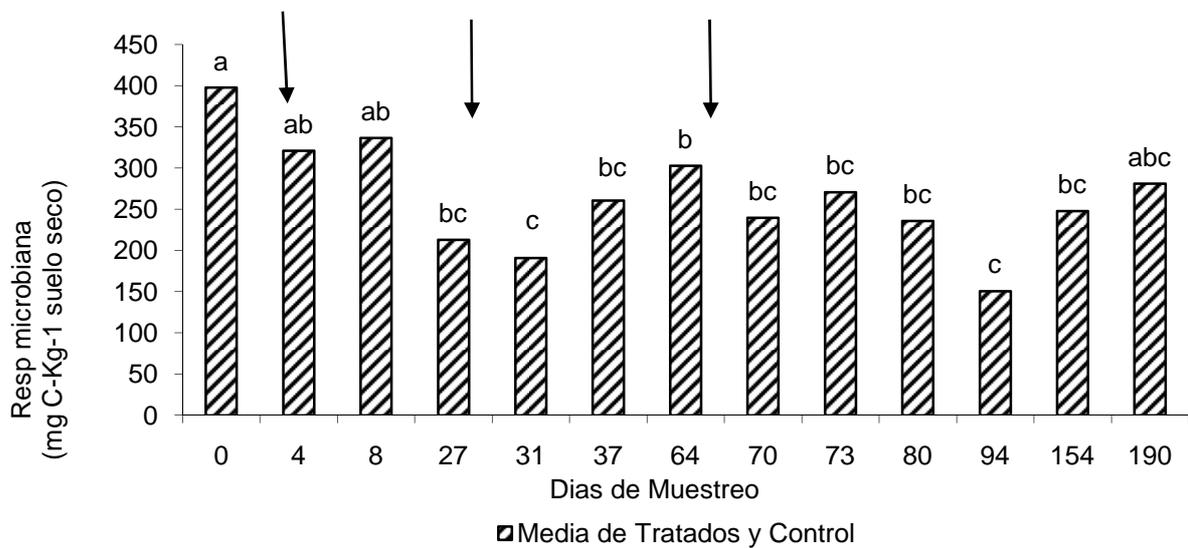


Figura 13. Valores promedio del Carbono correspondiente a la **respiración microbiana** (mg C-Kg⁻¹ suelo seco) como promedio de las parcelas control y tratadas con glifosato en los 190 días. Los días cero y 190 corresponden al primer y último muestreo (cosecha de soja) respectivamente. Las flechas indican las fechas de aplicación del herbicida (día cero, 27 y 64 del inicio del experimento). Las letras sobre las barras indican si existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos control y tratado con glifosato. Tratamientos señalados con la misma letra no difieren por Tukey al 5%. Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC). Paysandú, Uruguay (Período 2006- 2007).

En relación a los *Indices microbiológicos*: *Coeficiente microbiológico (qMic)*, *Cociente de mineralización del carbono orgánico (qM)* y *Cociente Metabólico (qCO₂)*, no se detectaron diferencias significativas en los efectos de los tratamientos ($p < 0,5183$, $p < 0,1898$ y $p < 0,4299$ respectivamente) ni en la interacción tratamiento por fecha de muestreo ($p < 0,9691$, $p < 0,2439$ y $p < 0,2097$ respectivamente). Se observaron diferencias significativas entre las fechas de muestreo ($p < 0,0041$, $p < 0,0001$ y $p < 0,0147$) para qMic, qM y qCO₂, respectivamente (**Figs. 14, 15 y 16**).

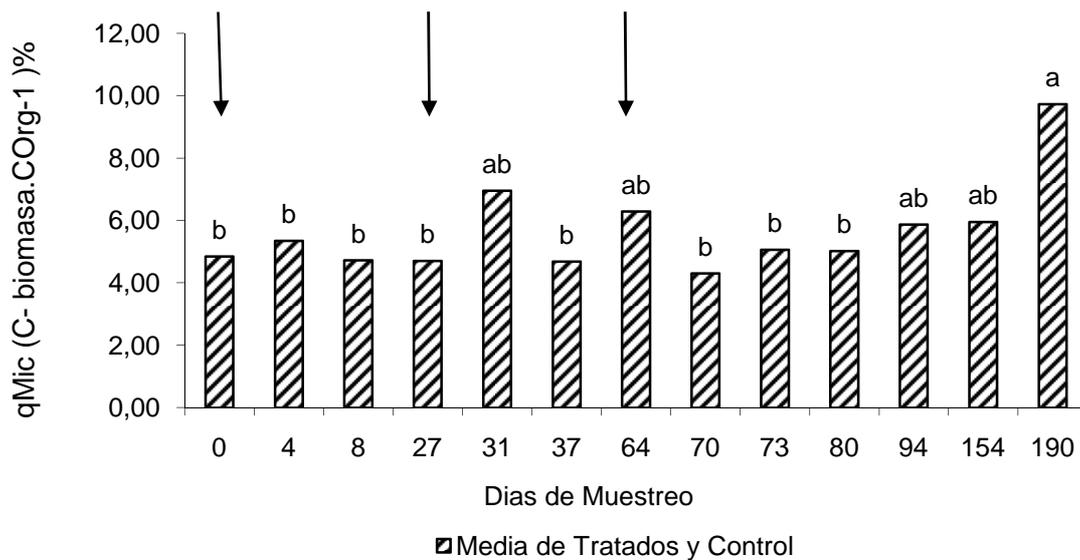


Figura 14. Valores promedio del **Coefficiente microbiológico** ($q_{Mic} = C\text{-biomasa microbiana}$ como porcentaje del C orgánico total) en las parcelas control y tratadas con glifosato en los 190 días. Los días cero y 190 corresponden al primer y último muestreo (cosecha de soja) respectivamente. Las flechas indican las fechas de aplicación del herbicida (días: 0, 27 y 64 del inicio del experimento). Las letras sobre las barras indican si existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos control y tratado. Tratamientos señalados con la misma letra no difieren por Tukey al 5%. Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC). Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

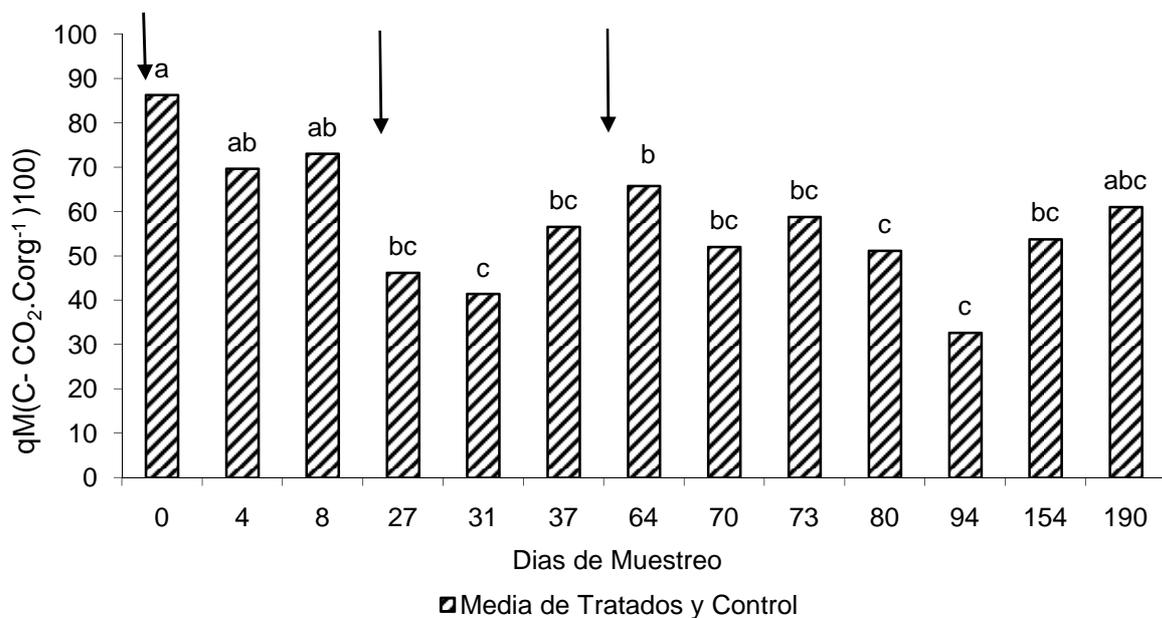


Figura 15. Valores promedio del **Cociente de mineralización del carbono orgánico** ($qM = \text{mg C-CO}_2 \text{ respiración} \cdot \text{C-total}^{-1} \cdot 100$) en las parcelas control y tratadas con glifosato en los 190 días. Los días cero y 190 corresponden al primer y último muestreo (cosecha de soja) respectivamente. Las flechas indican las fechas de aplicación del herbicida (días: 0, 27 y 64 del inicio del experimento). Las letras sobre las barras corresponden al promedio de los tratamientos control y tratado. Tratamientos señalados con la misma letra no difieren por Tukey al 5%. Estación Experimental “Dr. Mario. A.Cassinoni” (EEMAC). Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

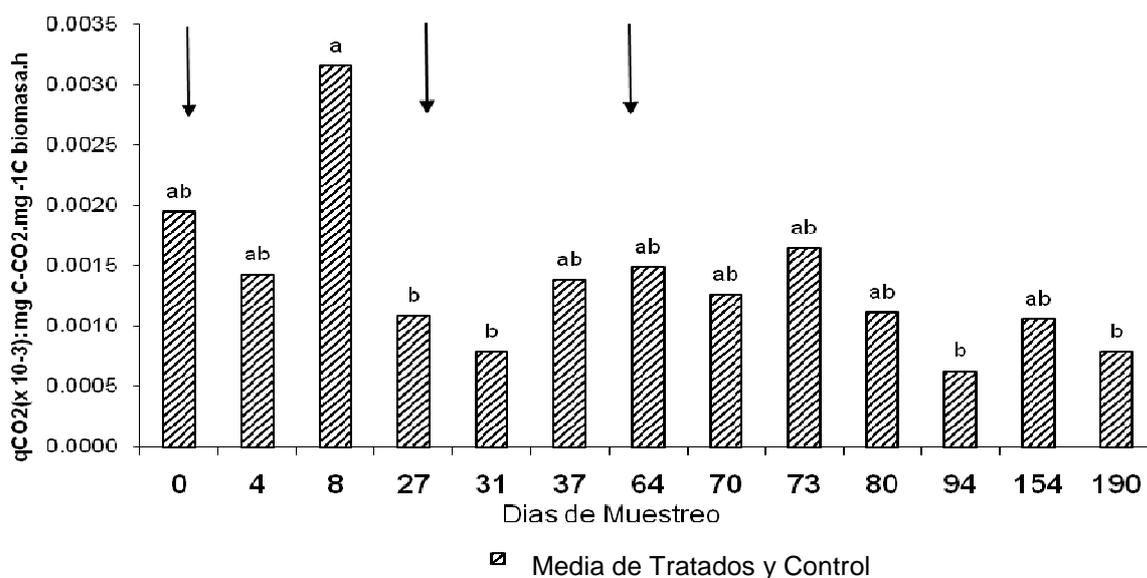


Figura 16. Valores promedio del **Cociente Metabólico** ($qCO_2 = C-CO_2 \cdot h^{-1} \cdot mg \text{ C-biomasa} \cdot h^{-1}$) en las parcelas control y tratadas con glifosato en 190 días. Los días cero y 190 corresponden al primer y último muestreo (cosecha de soja) respectivamente. Las flechas indican las fechas de aplicación del herbicida (día 0, 27 y 64 del inicio del experimento). Las letras sobre las barras corresponden al promedio de los tratamientos control y tratado. Tratamientos señalados con la misma letra no difieren por Tukey al 5%. Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

Análisis de las actividades enzimáticas: Fosfatasa Acida (FA), Fosfatasa Alcalina (FAL) e hidrólisis de FDA y las actividades enzimáticas relativas

En cuanto a las actividades enzimáticas: Fosfatasa Acida (FA), Fosfatasa Alcalina (FAL) e hidrólisis de FDA y las actividades enzimáticas relativas medidas al inicio y al final del experimento, en los tratamientos control y tratado con glifosato, *no se observaron diferencias significativas* en las parcelas control comparado con las parcelas tratadas con glifosato a un nivel de significación del 5%. Para su análisis fue ajustado un modelo que considera el efecto promedio de los tratamientos en todo el período de estudio, el efecto de las fechas de muestreo (inicio y final) y la interacción entre ambos. Si bien la fosfatasa alcalina (FAL) no resultó significativa al 5%, se encontró una tendencia en el promedio de los tratamientos ($P > 0,0758$). En este caso el efecto promedio del control sería superior al del tratado (**Anexo 12**).

6.3. Variables glifosato y AMPA

Se incluyen en este ítem los resultados de la *evaluación de las concentraciones del glifosato y AMPA* en las muestras de suelo. Estas variables fueron medidas en 8 momentos del experimento: 0 (inicio del experimento), 64 (inmediatamente después de la tercera aplicación), 70, 73, 80, 94, 154 y 190 días del inicio del mismo. En los momentos cero y 190, las concentraciones de glifosato y AMPA se determinaron en la totalidad de las parcelas (control y tratadas con el herbicida) y en los demás momentos (64, 70, 73, 80, 94 y 154) solamente en las parcelas tratadas (**Figura 17 y Anexo 13**).

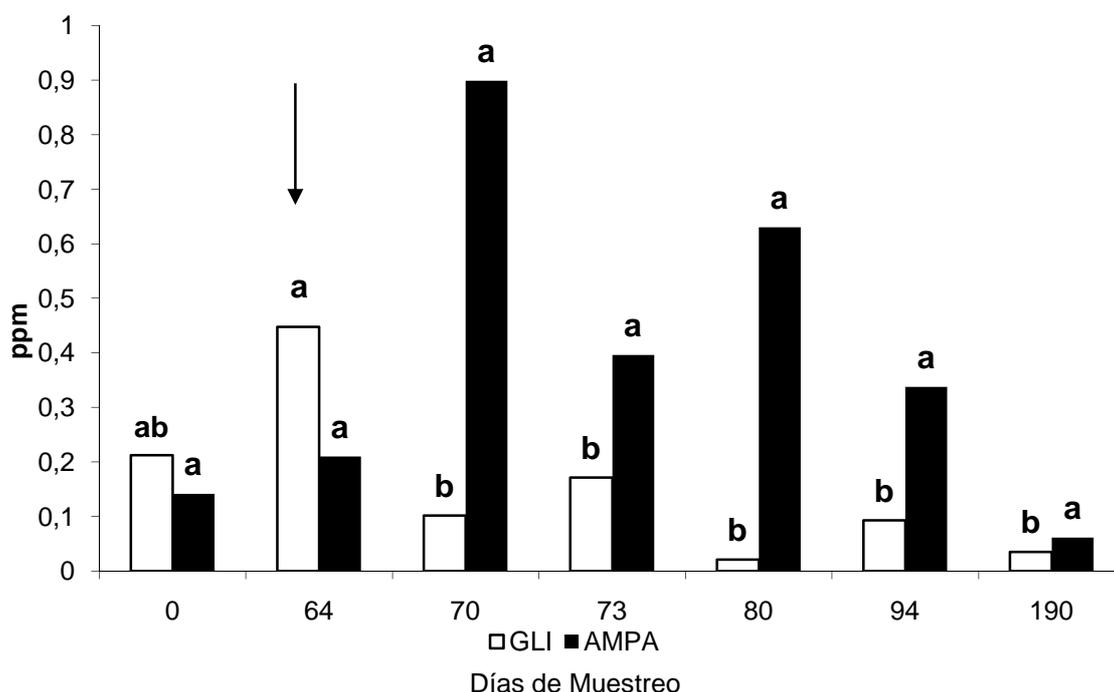


Figura 17. Valores promedio de glifosato y AMPA (ppm) en las parcelas tratadas con glifosato en los 190 días. Los días cero y 190 corresponden al primer y último muestreo (cosecha de soja) respectivamente. La flecha indica la fecha de aplicación del herbicida (64 del inicio del experimento, inmediatamente de la tercera aplicación). Las letras sobre las barras indican si existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos control y tratado. Tratamientos señalados con la misma letra no difieren por Tukey al 5%. Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC). Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

Estas variables fueron analizadas considerando un modelo de Análisis de Varianza con medidas repetidas en el tiempo, presentando diferencias significativas entre momentos de medición en los niveles de glifosato ($p < 0.003$) en el día 64 (tercera aplicación de glifosato), no encontrándose diferencias en los demás momentos de muestreo ni en los niveles de AMPA (**Anexo 13**). Tampoco se observaron diferencias significativas en las concentraciones de glifosato y AMPA en las parcelas control entre el inicio (día cero) y el final del experimento (día 190) (**Tabla 5**). Con respecto a las concentraciones de glifosato y AMPA en las parcelas control y tratadas a los 190 días del inicio del ensayo (último muestreo), no se detectaron diferencias significativas entre ambos tratamientos (**Tabla 6**).

Tabla 5. Valores promedio de glifosato (ppm) y AMPA (ppm) y valores de probabilidades al inicio del experimento (día 0), y al día 190 (cosecha de soja), determinados en las *parcelas control*. Estación Experimental: “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

ppm\día	Día cero	Día 190
	Control	Control
GLIFOSATO	0.212	0.030
p= 0,02		
AMPA	0.142	0.027
p= 0,0009		

Tabla 6. Valores promedio de glifosato (ppm) y AMPA (ppm) y valores de probabilidades en el día 190 (cosecha de soja), determinados en las *parcelas control y tratadas con glifosato*. Estación Experimental: “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

ppm\día	Día 190	Día 190
	Control	Tratada
GLIFOSATO	0.030	0.035
p= 0,237		
AMPA	0.027	0.100
p= 0,130		

Con respecto a la *vida media del glifosato y AMPA* determinada inmediatamente después de la tercera aplicación del herbicida (día 64) fue de 7 y 10 días respectivamente; lo que significa que el 50% de las concentraciones iniciales de glifosato y AMPA se detectaron al día 71 y al día 74 del inicio del experimento respectivamente. Para la determinación de la vida media de ambos productos se consideraron las concentraciones luego de la tercera aplicación del herbicida y hasta 16 días después (día 80 del inicio del experimento) debido a la presencia de muestreos frecuentes en dicho período. Se observa que el ajuste de la recta entre el logaritmo (base 10) de la concentración de AMPA y los días, a partir de la tercera aplicación y hasta 16 días después presenta un bajo valor de R^2 (**Anexos 14 y 15**).

El *promedio general* y el *Coefficiente de Variación* de la totalidad de las variables medidas (variables microbiológicas y de glifosato y AMPA) se presentan en el **Anexo 16**.

6.4.- Matriz de correlaciones

No se detectaron correlaciones lineales significativas al 5% *luego de la tercera aplicación y en los siguientes 3 muestreos* entre las variables microbiológicas, las variables glifosato y AMPA y las condiciones ambientales.

6.5.- Análisis Multivariado de Componentes Principales

Las variables consideradas en el *análisis multivariado de Componentes Principales* realizado a nivel de parcela fueron: biomasa microbiana, respiración microbiana, los índices microbiológicos: qC02, qM y qMIC y el glifosato y AMPA. Dichas variables fueron estandarizadas y resumieron la variabilidad total en un 74,7% en los dos primeros componentes (CP1: 41,4% y CP2 33,3%). El *coeficiente de correlación cofenética* fue de 0,906 indicando que el grado de distorsión al pasar de un universo multivariado a un plano fue pequeño (**Anexo 17**).

En la **Fig. 18** se presenta el “*biplot*” que corresponde a un gráfico donde se presentan conjuntamente las observaciones (en este caso las parcelas en los diferentes momentos) y las variables asociadas. Las observaciones se graficaron como puntos ubicados en las coordenadas de los Componentes Principales (CP), y las variables se graficaron como líneas, donde el *sentido de la flecha* indica hacia donde crecen sus valores, y la *longitud de la línea* indica la importancia relativa de cada variable.

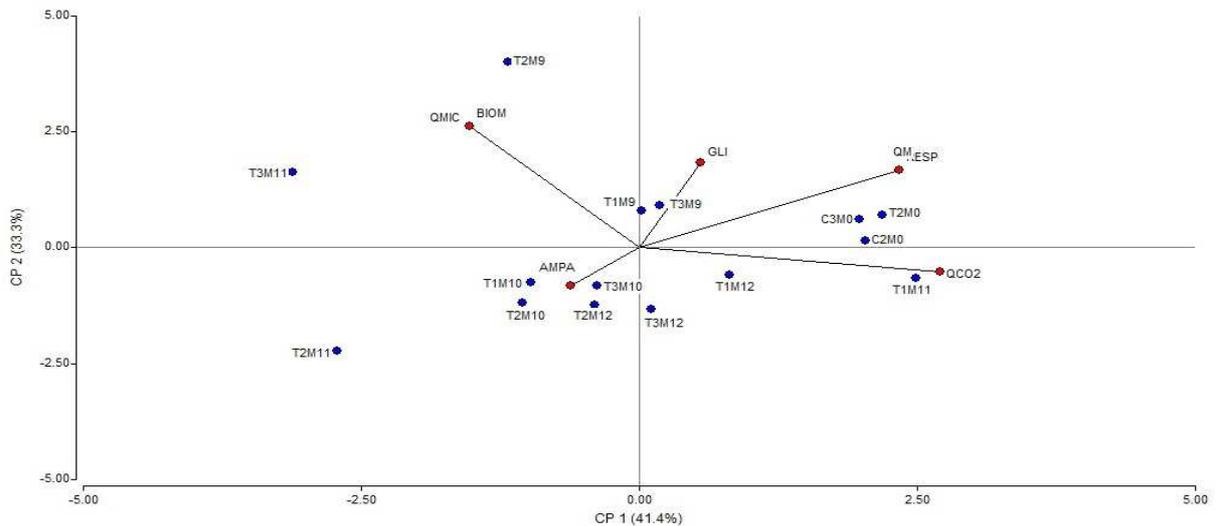


Figura 18. Análisis multivariado de Componentes Principales (CP) de la matriz: respiración microbiana, biomasa microbiana, Coeficiente de mineralización del Carbono Orgánico (qM), Coeficiente microbiológico (Mic), Coeficiente metabólico (qCO₂), glifosato y AMPA, medidas en las parcelas de los tratamientos control y tratado en los diferentes momentos. Los tratamientos se identifican con la letra “C” (control) y “T” (tratado con glifosato), el subíndice corresponde a la parcela y la letra “M” al momento de muestreo. Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC). Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

En el caso del Componente Principal 1 (CP1), las variables discriminatorias fueron: el Coeficiente de mineralización del Carbono Orgánico (qM): 0,82; el coeficiente metabólico (qCO₂): 0,95 y la respiración microbiana: 0,82, las cuales aumentaron hacia la derecha, indicando que los puntos en los cuadrantes I y IV tienen valores mayores de ellas en el CP1. A la inversa sucedió con las variables: Coeficiente microbiológico (qMic), biomasa microbiana y AMPA.

En el caso del Componente Principal 2 (CP2), las variables discriminatorias fueron: el qMic: 0,82 y la biomasa microbiana: 0,82 determinando que las parcelas con valores mayores de qMic y biomasa microbiana se encontraron en los cuadrantes I y II (asociadas con valores positivos del CP2) y las parcelas con valores mayores de AMPA, se encontraron en el cuadrante III.

Las parcelas con valores elevados de AMPA y de qMic y biomasa microbiana, integraron grupos diferentes de aquellas parcelas con valores altos de respiración microbiana, qCO₂ y qM.

7. DISCUSIÓN

En nuestro país no existe información disponible acerca de los efectos del uso prolongado del glifosato en diferentes dosis sobre los microorganismos del suelo. En este ensayo se evaluó el efecto de dosis sucesivas de glifosato sobre la comunidad microbiana por determinaciones del carbono de la biomasa, la respiración edáfica y ciertas enzimas, como las que hidrolizan el diacetato de fluoresceína, las fosfatasas ácida y alcalina, en un suelo con una larga historia de control de malezas con glifosato. Además se determinó la vida media del glifosato y AMPA en el suelo y sus respectivas curvas de disipación.

Los tratamientos control y los tratados con 3 aplicaciones sucesivas de Glifosato Ultra Max (74%) no presentaron diferencias significativas en las variables microbiológicas en la mayoría de los muestreos realizados cuando se analizaron en forma global y por período de estudio. Este hecho podría estar asociado a la *gran similitud existente en las parcelas control y tratadas* dado que todas ellas tuvieron la misma historia de aplicaciones del herbicida (13 años de aplicaciones sucesivas) diferenciándose únicamente en las 3 aplicaciones sucesivas realizadas en las parcelas tratadas. Los efectos del glifosato en la microbiota del suelo en el largo plazo pudieron haber producido un impacto mayor que sus efectos en el corto plazo. La totalidad de las investigaciones realizadas hasta el momento consideraron a las parcelas control sin historia previa de aplicaciones de glifosato. Otro hecho que pudo haber incidido fue la *variabilidad de los factores ecológicos* como el contenido hídrico del suelo, la temperatura y la actividad microbiana en respuesta a cambios en la disponibilidad de sustrato, y el manejo del suelo previo a las aplicaciones del pesticida, que pudieron enmascarar el efecto estimulante o depresivo del herbicida en estudio. Estos factores pueden ejercer mayor efecto que el pesticida sobre los microorganismos del suelo, como lo han señalado otros autores (Busse, *et al.*, 2001; Domsch, *et al.*, 1983). Según Weber *et al.* (1993) la humedad del suelo y la temperatura afectan directamente varios procesos biológicos, incluyendo el metabolismo de la planta y la degradación microbiana, y por lo tanto influyen en la biodisponibilidad y persistencia de los químicos.

La *ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos en la variable respiración microbiana* estaría de acuerdo con varias investigaciones que señalan que el glifosato es inocuo para los microorganismos del suelo a dosis recomendada en estudios de campo como son las dosis utilizadas en la presente investigación (Olson y Lindwall, 1991; Busse *et al.*, 2001) y cuando es aplicado en el suelo en ensayos de laboratorio (Busse *et al.*, 2001).

En contraposición, altas tasas de aplicaciones, han mostrado una estimulación en la respiración microbiana (Haney et al., 2000; Busse *et al.*, 2001) y efectos en los procesos del ciclo de los nutrientes (Carlise y Trevors, 1986; Muller *et al.*, 1981). Carlise y Trevors (1986), concluyeron que el glifosato puede estimular o inhibir los microorganismos del suelo, dependiendo del tipo de suelo y de la concentración del herbicida utilizada. Otros trabajos (Haney *et al.*, 2000; Busse *et al.*, 2001; Zabaloy, 2008) señalan que en las parcelas con glifosato presentaron valores mayores de respiración microbiana en relación a los testigos inmediatamente luego de las aplicaciones del herbicida. El glifosato es un compuesto fuerte y rápidamente adsorbido por los componentes del suelo. Por lo tanto puede afirmarse que su degradación ocurre de forma inmediata luego de la aplicación y esta decrece a medida que disminuye su disponibilidad. Esto explica los resultados obtenidos de varios estudios, como los de Sprankle *et al.*, 1975 y los de Haney *et al.*, (2000). Para Hart y Brookes (1996) estos efectos iniciales explican la falta de estímulos en la mineralización del C en investigaciones en las cuales las determinaciones se realizaron a partir del séptimo día. El aumento inicial de las poblaciones de los microorganismos luego de la aplicación de los herbicidas es frecuente (Kunck *et al.*, 1985). La microbiota mineraliza temporariamente los herbicidas utilizándolos como fuente de energía lo cual permite el aumento de la población. Eberbach (1998) estableció que las etapas tempranas de la degradación del glifosato ocurren casi exclusivamente en la fase de la solución del suelo, por lo que el C, N y P en la molécula de glifosato podría estar rápidamente disponible para los microorganismos que la degradan (Busse *et al.*, 2001). En general estos incrementos iniciales son seguidos de decrecimientos. Feng *et al.* (1990) también detectaron una rápida degradación inicial del glifosato seguida de una más lenta, lo que se atribuyó a la acción inicial de los microorganismos sobre el glifosato libre y posterior ataque del herbicida adsorbido en el suelo. Dado que los herbicidas con una relación C/N < 15 (C/N del glifosato es de 3/1) presentan la potencialidad de mineralizarse fácilmente y que los microorganismos heterótrofos requieren C y N para su sobrevivencia y crecimiento, el glifosato puede ser el responsable del incremento inmediato de la actividad microbiana del suelo (Haney, 1999; Araújo *et al.* 2003), encontraron mayor producción de dióxido de carbono en suelos tratados durante 6 años con glifosato que aquellos suelos tratados una sola vez. En este caso, las aplicaciones pudieron haber seleccionado las poblaciones microbianas capaces de utilizar el herbicida.

La ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos en la variable biomasa microbiana coincidiría con Haney *et al.*, (2000), los cuales, en un ensayo en laboratorio, trataron un suelo franco-limoso con glifosato a diferentes dosis, alguna de las cuales fue similar a la utilizada en el presente estudio y encontraron que el glifosato si bien estimuló la tasa de mineralización no alteró la biomasa microbiana. Los autores atribuyen estos resultados a la baja sensibilidad de la metodología utilizada. Liphadzi *et al.*, (2005) en un experimento de campo con diferentes herbicidas y sistemas de laboreo en un suelo franco limoso, utilizaron glifosato en una concentración de 1.12 kg i.a/ha y no encontraron diferencias en la biomasa microbiana evaluada por la técnica de fumigación- incubación ni en la respiración inducida por el sustrato (SIR). La alta variabilidad observada en las determinaciones de la biomasa microbiana se debería a otros factores y no al glifosato. Coincidentemente, Wardle y Parkinson (1991) observaron en experimentos de campo que los tratamientos con glifosato no alteraron la biomasa microbiana cuando el herbicida fue aplicado en parcelas agrícolas en dosis recomendadas y Busse *et al.*, (2001), tampoco encontraron cambios en dicha variable en el horizonte superior de suelos forestales. Gomez *et al.*, (2009) evaluaron el efecto de dosis crecientes de glifosato (48%) en un suelo Vertic Argiudoll (Argentina), en parcelas de soja continua, con 11 años de aplicaciones sucesivas de glifosato, en la biomasa y la actividad metabólica y en el cociente metabólico de la microbiota del suelo bajo condiciones controladas. A los 4 días de la aplicación del herbicida no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, con dosis de 0,48 y 0,96 l ia/ha, mientras que el control (sin historia de glifosato), fue significativamente menor en dosis superiores (1,92 y 3, 84 l ia/ha). Las dosis usualmente aplicadas en el campo son entre 0,96 y 1,92 l de ingrediente activo/ha. Hart y Brookes (1996) no encontraron efectos en la biomasa microbiana, mineralización del N o nitrificación en suelos agrícolas de Inglaterra luego de 9 años de aplicaciones de glifosato.

En relación a los resultados obtenidos en la *respiración microbiana acumulada* medida luego de la tercera aplicación y hasta 16 días post-aplicación, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, Fernandez (2007) encontró que a los 20 días de la aplicación del herbicida, el suelo tratado con glifosato liberó un 18% más de CO₂ acumulado en la respiración que el suelo testigo. En función de los resultados en la *respiración microbiana acumulada* es posible deducir que la mineralización del C tuvo un patrón similar a lo largo del período experimental tanto en el control como en el tratado con glifosato y que la degradación microbiana del herbicida se dio probablemente mediante un proceso de *catabolismo* y no de *cometabolismo*.

En la **Fig. 9** se puede observar que a medida que aumentan los días, la respiración acumulada aumenta a la misma tasa, presentando un *ajuste lineal significativo* tanto para el tratamiento control así como también para el tratado. En el *catabolismo* el herbicida es degradado en moléculas menores generando energía por los microorganismos del suelo. Consecuentemente el número y la biomasa microbiana aumentan a costa del sustrato y este disminuye en forma considerable. Se puede deducir que la degradación microbiana se llevó a cabo sin una fase de latencia inicial. La ausencia de la fase *lag* sugiere la rápida biodegradación de la molécula del glifosato. Según Tortstenson, (1985), Sprankle *et al.*, (1975), Strange-Hansen *et al.*, 2004 y Accinelli *et al.*, (2005), la degradación del glifosato ocurre sin fase de latencia y parece ser un proceso cometabólico. Ocurre bajo condiciones aerobias y anaerobias. Una rápida tasa de degradación inicial siguiendo por una más lenta y constante tasa de mineralización es el típico patrón de los procesos de degradación cometabólica de los xenobióticos. La presencia de sustratos fácilmente degradables estimula la comunidad microbiana del suelo e incrementa los procesos cometabólicos. Sprankle *et al.*, (1975) sostienen que la rápida fase de degradación inicial del glifosato puede ser debida a la biodegradación del glifosato libre, con una fase posterior más lenta correspondiente a la degradación del glifosato adsorbido.

En el presente estudio, cuando las variables microbiológicas fueron analizadas por período de estudio, se detectaron *diferencias significativas en la interacción entre tratamientos y fechas de muestreo* ($p < 0,0189$) en las variables: *respiración microbiana* y *qM* en el tercer período. En este período, se observaron además, *tendencias* ($p < 0.10$) en los efectos de tratamiento en dichas variables. Los mayores valores promedio de respiración microbiana y qM se detectaron en las parcelas control en todos los momentos observándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en el día 73, que corresponde a 9 días luego de la tercera aplicación de glifosato. En las parcelas control se liberó un 52,8% más de CO₂ proveniente de la respiración microbiana vs el tratado. El qM fue de 76,5 mg C-CO₂. C-orgánico⁻¹)100 en el control vs 40,5 mg C-CO₂. C-orgánico⁻¹)100 en el tratado. Al día 80 del inicio del experimento estas diferencias en las dos variables microbiológicas no mostraron diferencias significativas, indicando un efecto transitorio del herbicida en las variables medidas (**Fig. 12** y **Anexo 7**). La *menor respiración microbiana* y *qM* detectados en las parcelas tratadas vs las parcelas control en el día 73, concuerda parcialmente con los resultados observados por Fernandez (2007).

Dicho autor, analizando la actividad respiratoria en un suelo Latosol rojo oscuro (San Pablo-Brasil) tratado con glifosato en una dosis 100 veces mayor a la dosis recomendada por hectarea, no observó diferencias significativas entre los tratamientos con herbicida y el testigo que nunca recibió glifosato hasta los 8 días luego de la aplicación del herbicida. A partir de ese momento la respiración microbiana fue superior en el tratamiento con herbicida. Esos resultados no coinciden con la mayor parte de las investigaciones en las cuales los efectos del herbicida en las variables microbiológicas tienen lugar enseguida de las aplicaciones del herbicida.

La menor respiración microbiana encontrada podría atribuirse a las acumulaciones de AMPA en el suelo en el día 70 del inicio del experimento. Estos resultados coinciden con lo observado en el *Análisis de Componentes Principales* en el cual las parcelas tratadas con glifosato (T1, T2 y T3) en el momento 70 del inicio del experimento (M10), están asociadas a los mayores valores de AMPA (**Fig. 17 y Anexo 12**). Como se mencionó anteriormente, el principal metabolito de degradación del glifosato es el AMPA. Taiwo y Oso, 1997 y otros autores sostienen que en ocasiones las poblaciones microbianas a pesar de ser tolerantes a los herbicidas aplicados son susceptibles a los productos resultantes de la interacción suelo-herbicida liberados posteriormente. Junto a este metabolito se libera además el ácido glioxílico, que por su composición química no es una molécula tóxica para la actividad microbiana del suelo. Según Roberts (1998), dicha molécula es degradada a CO₂. Sin embargo, para que dicha transformación química ocurra, es necesario que el proceso de oxidación del ácido glioxílico ocurra, y para esto se debe consumir oxígeno en su degradación. Tejada (2009) supone que elevados niveles de ácido glioxílico en el suelo, consumen altos niveles de oxígeno para su degradación. El oxígeno utilizado en esta reacción química, puede ser “sustrato” para los microorganismos del suelo. Este hecho reduciría el C-biomasa y consecuentemente sus actividades intracelulares (deshidrogenasa), y sus actividades extracelulares (ureasa, beta glucosidasa, fosfatasa y arilsulfatasa). Por lo tanto, la carencia de oxígeno que ocurriría por la oxidación del ácido glioxílico podría ser responsable de la disminución de las propiedades biológicas del suelo durante el período de incubación luego de la adición del glifosato. El *análisis multivariado de los componentes principales* realizado en esta investigación concuerda con lo mencionado anteriormente donde se concluye que la parcela 2 que fue tratada con glifosato, en todos los momentos de evaluación graficados, presentó menores niveles de AMPA y mayores valores de respiración microbiana, de qM y de qCO₂ (**Fig.18 y Anexo 18**). Dicha parcela en el momento de evaluación 9 (luego de la tercera aplicación de glifosato), presentó valores pequeños de AMPA asociados a los residuos remanentes de las aplicaciones anteriores.

Al día 80, el tratamiento control y tratado con glifosato no mostraron diferencias significativas, indicando un efecto transitorio del herbicida en la variable medida. Este efecto temporario detectado coincide con los observados en varias investigaciones (Gómez, *et al.*; Fernandez, 2007; Haney *et al.*, 2002) que sostienen que en pocos días se retorna a las condiciones originales.

Weaver, *et al.*, (2007) encontraron en un estudio en un suelo de Missisipi que el glifosato aplicado a dosis de campo y mayores a dosis de campo producen pequeños y transitorios cambios (menores a 7 días) en la comunidad microbiana del suelo.

Otro resultado que surge de la presente investigación realizada es que *el efecto promedio del momento de muestreo resultó estadísticamente significativo para biomasa* ($p < 0,0041$) y *respiración microbiana* ($p < 0,0001$) cuando las variables se analizaron en forma global. La *respiración microbiana presentó los mayores valores promedio al inicio del experimento, en los dos muestreos posteriores* (días 0, 4 y 8 respectivamente) y al día 190, siendo estadísticamente diferentes de los obtenidos en los demás momentos de muestreo cuando las variables microbiológicas se analizaron en forma global (**Figs 11 y 13**). Esto está de acuerdo con lo observado en el *análisis multivariado de componentes principales* realizado en este estudio en el cual las parcelas, al inicio del experimento (C2M0, C3M0 y T2M0), se encontraron agrupadas en la gráfica dentro del primer cuadrante, asociadas con los valores más elevados de qM, respiración microbiana y qCO₂ y con valores menores de biomasa microbiana, qMic y AMPA (**Fig. 18 y Anexo 18**). Además, *los mayores valores de biomasa microbiana promedio: 1868 mg C-Kg⁻¹ suelo seco, se obtuvieron a los 190 días de inicio del experimento que se corresponde con 126 días de la última aplicación cuando se analizaron las variables microbiológicas en forma global. Este valor fue estadísticamente significativo y superior que los obtenidos a los 0, 4, 8, 27, 37, 70, 73 y 80 días de inicio del experimento. (Fig. 11).* Por otro lado, en el primer período de estudio y en el tercero se encontraron *tendencias en los valores promedio por fecha de muestreo* ($p < 0.0643$) en las variables microbiológicas: respiración microbiana y qM cuando éstas se analizaron por período de estudio (**Anexo 7**).

El cociente metabólico, qCO₂ tampoco presentó diferencias significativas entre los tratamientos, aunque en el Análisis de Componentes Principales se detectaron los mayores valores al inicio del experimento, en ausencia de las 3 aplicaciones del herbicida. Gomez, et al (2009), observaron incremento en la respiración diaria por unidad de biomasa luego de la aplicación de elevadas dosis de glifosato.

Dichos autores evaluaron el efecto de dosis crecientes de glifosato en la biomasa y la actividad metabólica y en el cociente metabólico de la microbiota del suelo bajo condiciones controladas. En un experimento, se aplicó una formulación comercial de glifosato (48%), en un suelo Vertic Argiudoll (Argentina), ubicado en bandejas, en dosis de 0,48; 0,96; 1,92 y 3,84 l ia/ha. Las dosis usualmente aplicadas en el campo son entre 0,96 y 1,92 l ia/ha. Los tratados y el control fueron incubados a 25°C y 75% de capacidad de campo. Luego de 4 y 45 días de la aplicación del glifosato, fueron determinados: la biomasa microbiana, respiración microbiana, cociente metabólico (qCO_2) y la actividad deshidrogenasa. La biomasa microbiana al día 4 de la incubación no difirió significativamente entre el control y las dosis de 0,48 y 0,96 l, mientras que fue significativamente menor en las mayores dosis. Luego de 45 días la biomasa microbiana, en la dosis de 3,84 l fue significativamente menor que el control. La respiración mostró diferencias significativas durante el período de tiempo pero no entre dosis. Se encontraron diferencias significativas en el qCO_2 entre dosis en los dos períodos de incubación con mayores valores promedio en el tratamiento tratado versus el control. La actividad deshidrogenasa fue significativamente mayor en los tratamientos con glifosato que en el control al inicio de la incubación. Las variables analizadas mostraron un efecto inicial inhibitorio que afectó las células microbianas. Sin embargo este efecto fue temporal en dosis equivalentes o mayores que las dosis utilizadas en el campo. Varios autores (Anderson, 2003.; Melero, *et al.*; 2006) han propuesto el empleo de índices, como el cociente metabólico o la actividad metabólica específica (referida por unidad de carbono de la biomasa) como indicadores del impacto ambiental ya que una mayor actividad respiratoria por unidad de biomasa microbiana en las parcelas tratadas se correspondería con una mayor energía de mantenimiento requerida por los microorganismos bajo condiciones de estrés ocasionadas por el glifosato.

Las *actividades enzimáticas de hidrólisis del FDA, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina*, medidas al inicio y al final del ensayo no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (**Anexo 12**). Si bien la fosfatasa alcalina no resultó significativa al 5%, se encontrarían diferencias a un nivel de significación levemente superior (nivel de significación del 10%) ya que $P > F = 0.0758$. En este caso el efecto promedio del control sería superior al del tratado. Existen referencias de incrementos temporarios en la actividad de la microbiota del suelo (Wardle y Parkinson, 1990; Haney *et al.*, 2000; Busse *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2003) para el caso de aquellos herbicidas con potencial de rápida mineralización y posibles de ser utilizados como fuente de C, P y N para el crecimiento de poblaciones de bacterias gram positivas y gram negativas, como es el caso del glifosato. Como se mencionó anteriormente, los efectos del glifosato son transitorios y tienen lugar durante los primeros días luego de las aplicaciones.

La ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos control y tratado con el herbicida en la enzima FDA correspondiente al ensayo, podría deberse al período de tiempo prolongado (6 meses) entre las determinaciones (al inicio del experimento y en la cosecha de soja) dado a que los efectos del herbicida en las actividades enzimáticas se dan en gral los primeros días posteriores a las aplicaciones de glifosato. En un estudio realizado por Zabaloy (2008), se seleccionaron tres suelos de la Pampa Argentina sometidos a repetidas aplicaciones de glifosato. Los suelos fueron un Petrocalcic Paleustol, un Typic Argiudoll y un Typic Haplaustoll, los cuales se obtuvieron de parcelas con laboreo reducido. La aplicación de glifosato en una dosis diez veces mayor a la recomendada por hectarea, dio lugar a efectos de corto plazo en algunas actividades enzimáticas (respiración inducida por el sustrato, FDA y actividad deshidrogenasa).

En general, se observaron incrementos de las bacterias heterótrofas aerobias, la respiración inducida por el sustrato dentro de la primera semana luego de la aplicación del glifosato. La actividad deshidrogenasa no mostró cambios consistentes debido a la aplicación del glifosato, mientras que la FDA tuvo una reducción del 14% en su actividad enzimática en las parcelas tratadas vs los controles a los 7 días de la aplicación del herbicida.

Andrea *et al.*, 2003, encontraron diferencias significativas en la actividad deshidrogenasa enseguida de realizada la segunda aplicación de glifosato, mostrando que el herbicida puede estimular los procesos oxidativos del suelo, sin embargo dos meses luego de la aplicación de glifosato, no se detectaron diferencias significativas en la cantidad de formazán, independientemente del número de aplicaciones (1, 2, 3 y 4), demostrando que el efecto del herbicida en la actividad enzimática es transitorio, lo que fue demostrado también para otros pesticidas. Parece ser que el glifosato o sus productos de degradación prácticamente no afectaron la actividad de esta enzima en el suelo estudiado. Sannino y Gianfreda (2001) detectaron diferentes respuestas de varias enzimas de diferentes suelos tratados con glifosato.

La tendencia observada en la fosfatasa alcalina puede explicarse por la investigación llevada a cabo por Tejada (2009). El mismo, realizó un estudio en España sobre la degradación y los efectos en los parámetros biológicos en dos suelos: Typic Haploxeralf (arenoso) y Vertic Chomoxerert (arcilloso) luego de la aplicación de glifosato, diflufenican (herbicida pre y post emergente utilizado en el control selectivo de malezas de hoja ancha) y glifosato + diflufenican, en condiciones de laboratorio. Las actividades biológicas determinadas fueron el C de la biomasa microbiana, las actividades fosfatasa alcalina, ureasa, beta glucosidasa, arylsulfatasa y deshidrogenasa.

Las variables microbiológicas se determinaron los días: 0, 1, 5, 10, 15, 30, 60, 120 y 180. Todas las variables medidas decrecieron a través del período experimental con respecto al suelo control (sin historia de aplicaciones de herbicidas). La disminución fue mayor en el suelo arenoso que en el arcilloso debido a que el glifosato se encuentra en mayores concentraciones en la solución del suelo produciendo mayores efectos en la microbiota. Además, el decrecimiento de las variables microbiológicas fue mayor en el suelo incubado con glifosato + diflufenican, siguiendo con los tratamientos de diflufenican y glifosato, teniendo los mayores valores de actividades enzimáticas en el tratamiento control. Concluyó que aplicación del glifosato en mezcla con el diflufenican (herbicida), en ambos suelos incrementó la persistencia individual de cada herbicida e incrementó los efectos tóxicos de ambos herbicidas en la actividad biológica del suelo.

Los resultados obtenidos en el *glifosato* y *AMPA* revelaron que la *vida media del glifosato y del AMPA* medida inmediatamente después de la tercera aplicación del herbicida (día 64) fue de 7 y 10 días respectivamente (**Anexos 14 y 15**). Esto significa que el 50% de las concentraciones iniciales de glifosato y AMPA se detectaron al día 71 y al día 74 del inicio del experimento respectivamente. Según los resultados del presente estudio, el glifosato y AMPA presentan una rápida degradación microbiana en este suelo. En un estudio realizado por Kools, *et al.*, (2005), contrariamente a la hipótesis planteada por ellos, encontraron una rápida degradación del glifosato en suelos contaminados con metales pesados, presentando una vida media del herbicida que varió entre 5 y 23 días. Dichas tasas de degradación del glifosato parecen ser consistentes con la literatura (Cheah *et al.*, 1998; Eberbach, 1998). Lo observado en la presente investigación puede estar parcialmente explicado por la adaptación microbiana producida durante los 13 años de aplicaciones de glifosato (3 a 4 aplicaciones anuales). La vida media del glifosato depende principalmente de la actividad microbiana y no de la descomposición química o fotodescomposición (Carlise and Trevors, 1988). Los resultados obtenidos concuerdan con los señalados por otros autores en otros pesticidas que son degradados principalmente por la actividad microbiana del suelo al igual que el glifosato, como sucede con el aldicarb. Bromilow *et al.*, (1996) realizando aplicaciones anuales de más de 5 pesticidas (aldicarb, chlorfenvinphos, carbendazim, triadimefón y glifosato), durante más de 20 años en cebada de primavera encontraron para el caso del aldicarb (insecticida carbamato aplicado al suelo), que a diferencia de los demás pesticidas examinados (chlorfenvinphos, carbendazim, triadimefón), su degradación en el suelo estuvo fuertemente influenciada por la historia de los tratamientos recibidos. La transformación inicial de este insecticida mediante procesos químicos de oxidación se dio rápidamente independientemente de la historia de los tratamientos.

Sin embargo la degradación microbiana responsable de las demás transformaciones de la molécula, fue 18 veces más rápida en aquellas parcelas de suelo que recibieron aplicaciones repetidas con este carbamato comparado con suelos sin historia de aplicaciones. Este hecho lleva a deducir que los procesos de adaptación microbiana son duraderos y permanecen en el tiempo. Por otro lado, es de destacar que la breve vida media del glifosato y de su metabolito de degradación pueden explicarse además por las *condiciones favorables de temperatura de suelo y de agua disponible* en los días posteriores a la tercera aplicación (temperatura media entre 28 y 30°C y entre un 50 y 100% de agua disponible aproximadamente) favorables para la degradación microbiana (**Figs. 7 y 8 y Anexo 6**).

La ausencia de correlaciones lineales significativas al 5% *luego de la tercera aplicación y en los siguientes 3 muestreos* entre las variables microbiológicas, las variables glifosato y AMPA y las condiciones ambientales podría explicarse por el bajo número de observaciones considerado y las grandes variaciones en el agua disponible en el suelo en los 7cm superiores del suelo en el período estudiado. Según Allietto *et al.*, (2006), el comportamiento de los pesticidas y el destino en el ambiente, dependen de las propiedades físicas y físico-químicas del pesticida, pero también dependen de las variables físicas, como son la temperatura y el contenido de agua. Como indicaron Cupples *et al.*, (2000), cuando la actividad biológica está involucrada en la degradación de los pesticidas, se observa frecuentemente una temperatura óptima, mientras que los mecanismos físico-químicos, generalmente exhiben un incremento exponencial con la temperatura. Dicha temperatura óptima varía según los microorganismos involucrados (Mc Donald *et al.*, 2005) y de los pesticidas (Dakhel *et al.*, 2001). La temperatura es el principal factor que controla los procesos de degradación biótica y abiótica (Allietto, *et al.*, 2008). Según Rampoldi (2008), con bajos contenidos de agua, la actividad microbiana en general se enlentece, resultando en una mayor persistencia de los pesticidas (Alletto, *et al.*, 2006). Por otro lado, bajos contenidos de agua pueden reducir la difusión de los pesticidas e incrementar el tiempo de contacto entre el pesticida y los componentes del suelo aumentando la fracción del pesticida no disponible para los microorganismos debido a la adsorción (Cox y Walker, 1999).

Por otra parte, se podría deducir que la breve vida media del glifosato y AMPA detectadas en este estudio podría estar explicada por los *elevados contenidos de materia orgánica* característicos de estos suelos, asociado a una mayor actividad biológica. Según Torstesson (1985), ciertos suelos presentan una capacidad específica en degradar el glifosato, que depende de la presencia natural de la población microbiana que produce las enzimas necesarias para catalizar la degradación del herbicida.

Los suelos con altos contenidos de materia orgánica mineralizaron el glifosato más rápidamente inicialmente que los suelos con menor carbono orgánico, posiblemente debido a una mayor biomasa microbiana. La rápida disipación del glifosato en un suelo sin laboreo se debe a una *activa y diversa comunidad microbiana unida a una mayor abundancia de sustratos carbonados disponibles*. En sistemas de laboreo conservacionista la mineralización del glifosato es muy alta (Haney, 2000).

Otro factor que podría explicar la breve vida media del herbicida y su metabolito son las abundantes precipitaciones existentes que dieron lugar a excesos de agua en los 7cm superiores del suelo (profundidad de muestreo) antes o luego de realizadas las aplicaciones pudiendo haber *transportado verticalmente los compuestos a horizontes más profundos* fuera del área de muestreo (**Anexo 6**). La vida media y la persistencia del glifosato en la solución del suelo es mayor en experiencias de laboratorio que en el campo debido a la ausencia de procesos de lavado (Tejada, 2009). Veiga *et al.*, (2001), determinaron los residuos de glifosato y AMPA en un suelo forestal en el noroeste de España tratado con 5 y 8 l/ha de glifosato. El suelo se muestreó en dos profundidades: de 0-20cm y de 20 a 35cm en varios momentos luego de las aplicaciones del herbicida. Se encontró una alta movilidad vertical del glifosato y AMPA en el suelo tratado, enriqueciendo rápidamente con altas concentraciones a los horizontes subsuperficiales donde la degradación es menor. Esto se explica por la alta solubilidad del glifosato que permite su migración en la solución junto con la porosidad y moderada permeabilidad del suelo tratado y las precipitaciones durante el período estudiado. Por otra parte, es sabido que el laboreo conservacionista resulta en un *aumento de la infiltración del agua*. Peruzzo *et al.*, (2009) señalaron que los eventos de lluvia (65mm) juegan un notable rol transportando el glifosato presente en el suelo asociado a su elevada solubilidad en agua. El glifosato también puede ser transportado unido al material suspendido; dicho transporte fue posible durante algunos eventos de tormenta que ocurrieron en el período monitoreado. La variabilidad en la humedad y en la temperatura durante el período de monitoreo pudo resultar en variaciones en la descomposición y la movilidad del glifosato y AMPA. La mayor concentración de glifosato y AMPA en el horizonte subsuperficial podría explicarse no solamente a la movilidad del herbicida en la solución del suelo sino también a la *diferencia de actividad biológica entre los dos horizontes*. La mayor actividad microbiana en el horizonte superficial causa una degradación más rápida en esa profundidad.

Esta situación muestra la importancia de la existencia de un horizonte rico en materia orgánica, con una actividad biológica que promueve la descomposición del herbicida, con la suficiente profundidad para permitir su metabolización antes de llegar a horizontes de suelo más profundos o a aguas subterráneas, donde los procesos de degradación son más lentos.

La *mayor vida media detectada en el metabolito AMPA vs el glifosato* concuerda con lo observado por varios autores. De modo general, está citado que la vida media del glifosato es menor que la del AMPA, lo que explicaría la detección de acumulaciones de AMPA en suelos con elevadas dosis de ese herbicida (Bohm, *et al.*, 2008). Torstensson (1985) encontró una degradación más lenta del AMPA que del glifosato en algunas instancias, reflejando un fuerte enlace con las partículas de suelo. Araújo *et al.*, (2003), detectaron mayores cantidades de AMPA en suelos agrícolas tratados varias veces con glifosato que en suelos tratados una sola vez, lo que muestra que el AMPA puede ser acumulado en el suelo y es más persistente que el glifosato. Según Kjaer (1999) el AMPA fue detectado un año después de la aplicación, indicando una menor liberación y una capacidad de degradación limitada dentro de un suelo agrícola de Dinamarca.

La persistencia del glifosato y AMPA en el suelo Brunosol eútrico correspondiente al ensayo fue mayor a 126 días (días entre la tercera aplicación del herbicida y último muestreo, correspondiente a la cosecha de la soja) en las parcelas tratadas y mayor a 190 días en las parcelas control. Con respecto a las concentraciones de glifosato y AMPA al inicio del ensayo y en el último muestreo (día 190) determinadas en las parcelas control, no se detectaron diferencias significativas (**Tabla 5**). Si bien a los 190 días aún se detectaron concentraciones de glifosato y AMPA en suelo en las parcelas control y tratadas, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los compuestos (**Tabla 6**). Uno de los efectos ambientales más importantes en el uso de los pesticidas es la persistencia en el suelo ya que mientras más persistente sea, mayor será la probabilidad de que los residuos afecten la microflora del suelo y se incorporen a cadenas tróficas que pueden terminar en el hombre y mayor será la probabilidad de que aplicaciones sucesivas lo lleven a acumularse hasta alcanzar niveles tóxicos (CONAMA, 2001; Téllez, 2002). La *adsorción de los pesticidas* en el suelo juega un rol fundamental en su destino debido a que este hecho condiciona su presencia en la solución del suelo y por lo tanto su disponibilidad para una posible degradación microbiana y/o disipación en el ambiente (Al Rabaj y Schiavon, 2005).

Según Braja y Alfonso, 2005, *esta fuerte adsorción se opone a su degradación* que es esencialmente de naturaleza biológica y puede dar lugar a persistencias relativamente largas. Veiga *et al.*, (2001) y Calderón (2005), concluyeron que la persistencia del glifosato en el suelo depende del *contenido de arcilla*. Los altos contenidos de arcilla incrementaron el tiempo de degradación del glifosato posiblemente debido al proceso de adsorción de esta molécula orgánica con las arcillas con iones metálicos (Pessagno *et al.*, 2008). La persistencia del glifosato y AMPA en el presente estudio podría asociarse a una fuerte adsorción de los compuestos debido a la predominancia de minerales dominantes de tipo 2:1, o sea de carga mayoritariamente permanente como son la montmorillonita e illita a los elevados tenores de materia orgánica en estos suelos y a la acidez del suelo (pH 5,5). Al Rabaj y Schiavon (2005), realizaron un estudio sobre la adsorción del glifosato en 3 suelos agrícolas representativos de una región francesa: un suelo limo-arcilloso, pH: 6,3, un suelo arcillo-limoso, pH: 7.9 y un suelo areno-limoso, pH: 5,1. Dichos autores encontraron que el incremento del pH de los suelos provoca una fuerte reducción de la adsorción del glifosato. Sin embargo, su persistencia depende de la adsorción pero también de las condiciones ambientales presentes (precipitaciones, temperatura, actividad microbiana, etc). La composición del suelo, el porcentaje de materia orgánica, el nivel de nutrientes y los niveles de humedad son importantes reguladores de la actividad degradativa (Douglas, *et al.*, 1991). La moderada persistencia del glifosato y AMPA en este estudio podría deberse a las condiciones anaerobias casi permanentes presentes en los 7 cm de suelo desde el 20/02/07 al 2/05/07. El exceso de agua puede reducir la disponibilidad de oxígeno para los microorganismos y por lo tanto decrecería la degradación de los compuestos xenobióticos (Kruger *et al.*, 1993).

Tejada (2009) concluyó que la aplicación del glifosato en mezcla con un herbicida (diflufenican), en un suelo arenoso y otro arcilloso incrementó la persistencia individual de cada herbicida e incrementó los efectos tóxicos de ambos herbicidas en la actividad biológica del suelo. En el presente se realizaron aplicaciones de varios fitosanitarios, además del glifosato, en las parcelas control y tratadas como son los insecticidas: Metoxifenocide, Endosulfán, Cipermetrina; en los meses de enero y febrero de 2007 pudiendo haber incrementado la persistencia del glifosato (**Tabla 3**).

Otro resultado relevante que surge de la presente investigación son los incrementos de glifosato luego de la tercera aplicación (días 73 y 80 del inicio del experimento) (**Tablas 5 y 6**). Estas concentraciones no son explicadas por las aplicaciones del herbicida realizadas en el cultivo.

También se observaron incrementos de AMPA en el suelo, con concentraciones mayores a las esperadas provenientes de la degradación del glifosato en los días 70, 80 y 94 del inicio del experimento. Las concentraciones de glifosato y AMPA en el ensayo presentaron elevados coeficientes de variación (114 y 144 % respectivamente) lo que refleja la gran variabilidad dada en condiciones de campo (**Anexo 17**). En el estudio in vitro realizado por Tejada (2009) donde determinaron las concentraciones de glifosato en el suelo luego de una aplicación del herbicida, en ausencia de cultivos, se observó una disminución en forma constante con el tiempo en ausencia de incrementos en las concentraciones de dichos compuestos como lo sucedido en el presente ensayo. La degradación microbiana de una molécula de glifosato produce una molécula de AMPA (**Figura 5**). A pesar que el glifosato no está recomendado para la aplicación directa en el suelo, una cantidad significativa puede enriquecer al mismo a través de varios mecanismos. Durante la estación temprana del crecimiento del cultivo, por aplicaciones foliares de pre-emergencia (Haney *et al.*, 2000), lavado foliar del herbicida y/o de sus metabolitos de degradación, contaminación indirecta de la deriva del producto (Ellis y Griffin, 2002), exudación radicular o muerte y descomposición de los residuos de las plantas tratadas (Laitinen, *et al.*, 2007).

8. CONCLUSIONES

- Las sucesivas aplicaciones de glifosato Ultra Max en el cultivo de soja a dosis recomendada de campo (1,6 l/ha) resultaron en cambios pequeños y transitorios en las variables microbiológicas evaluadas por el carbono de la biomasa microbiana, la respiración edáfica y las actividades fosfatasa ácida, alcalina y FDA. Existieron diferencias significativas en el efecto promedio del momento en que se realizó el muestreo. Las variaciones observadas estuvieron más relacionadas a cambios estacionales (humedad, temperatura, rastros) que al efecto del herbicida. Esto pudo deberse fundamentalmente a la gran similitud existente en las parcelas tratadas y control debido a que todas estuvieron sometidas a 13 años de aplicaciones de glifosato, diferenciándose únicamente en las 3 aplicaciones sucesivas realizadas en las parcelas tratadas. El tratamiento control sin historia de glifosato, no se incluyó en este estudio ya que el objetivo fue trabajar en sistemas de agricultura continua en siembra directa, instalados durante 13 años.

- La respiración microbiana y el cociente de mineralización del carbono orgánico (qM) fueron afectados significativamente en el día 73 del inicio del experimento, que corresponde a 9 días luego de la tercera aplicación de glifosato. En la respiración microbiana ($p < 0,0189$), se liberó un 52,8% más de CO_2 en el control versus el tratado, obteniendo $354 \text{ mg CO}_2 \text{ Kg}^{-1}$ suelo seco y $187 \text{ mg CO}_2 \text{ Kg}^{-1}$ de suelo seco respectivamente. El qM, ($p < 0,0189$) presentó un valor de $76,5 \text{ mg C-CO}_2 \cdot \text{C-orgánico}^{-1} \cdot 100$ en el control versus $40,5 \text{ mg C-CO}_2 \cdot \text{C-orgánico}^{-1} \cdot 100$ en el tratado. Al día 80, los tratamientos control y tratado con glifosato no mostraron diferencias significativas en ninguna de las dos variables microbiológicas mencionadas indicando un efecto transitorio del herbicida sobre dichas variables. El comportamiento de la respiración microbiana y del qM se puede explicar por los niveles de AMPA presentes en el suelo en el día 70 del inicio del experimento.

- Si bien las correlaciones lineales calculadas luego de la tercera aplicación no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las parcelas controles y las tratadas, el análisis de los componentes principales evidenció valores superiores de la respiración edáfica y del qM a medida que disminuye la concentración de AMPA en el suelo. Estos datos confirman resultados de la bibliografía relacionados a efectos depresivos de la degradación del glifosato en AMPA y glioxilato sobre la microbiota del suelo.

El alto consumo de O_2 requerido en la degradación de este último, explica la disminución en actividad biológica.

- Las actividades enzimáticas analizadas, relacionadas a actividades hidrolíticas generales y al ciclo del fósforo (fosfatasa) no fueron afectadas por las aplicaciones repetidas del herbicida. Su determinación fue realizada al inicio y al final del experimento, circunstancia que pudo no haber coincidido con los momentos de mayor efecto del herbicida y su derivado sobre la microbiota del suelo. Si bien la fosfatasa alcalina no resultó significativa al 5%, se encontró una tendencia en el promedio de los tratamientos ($P > 0,0758$). En este caso el efecto promedio del control sería superior al del tratado.
- Si bien los análisis de varianza no mostraron en general diferencias significativas entre tratamientos, el análisis de componentes principales mostró valores superiores de respiración microbiana, qM y qCO_2 en las parcelas al inicio del experimento.
- La vida media del glifosato y de su derivado, el AMPA calculada en el suelo Argiudol Típico fue de 7 y 10 días, respectivamente. Este breve período, confirma datos de la bibliografía y se puede explicar por la presencia de una activa población microbiana capaz de degradar al herbicida y a su derivado (AMPA) producto de la selección producida durante los 13 años de aplicaciones del herbicida. El elevado tenor de materia orgánica característico de estos suelos asociado a una importante actividad biológica y las condiciones ambientales (temperatura del suelo y agua disponible) favorables para la degradación microbiana durante el período de estudio pueden también explicar los valores de vida media. Otra explicación a estos resultados pueden encontrarse en las abundantes precipitaciones producidas antes o luego de las aplicaciones que pudieron trasladar en forma vertical al herbicida y su metabolito a horizontes inferiores, por debajo de la profundidad de muestreo (7cm)
- Residuos de glifosato y AMPA fueron detectados en el suelo 190 días luego de las aplicaciones realizadas en las parcelas control (momento de la cosecha de la soja), hecho que puede asociarse a la acidez del suelo, presencia de elevados tenores de arcillas (montmorillonita e illita) y materia orgánica que adsorben el herbicida afectando la degradación por la microbiota del suelo e incrementando la persistencia. Otro factor que pudo haber incidido en la moderada persistencia del glifosato y AMPA fueron las aplicaciones de insecticidas realizadas en el ensayo aumentando los efectos tóxicos del glifosato sobre los microorganismos del suelo.
- Además de las variables microbiológicas clásicas evaluadas en este estudio, surge la necesidad de incorporar la evaluación de poblaciones microbianas específicas (fijadores de N_2 , nitrificantes, etc.) y aquellas no cultivables, mediante la evaluación de la biodiversidad microbiana ya que el glifosato actúa como agente de selección en la microbiota del suelo.

- Se concluye finalmente, que es necesario respetar las dosis recomendadas del glifosato en los distintos sistemas de manejo del suelo y en lo posible, limitar sus aplicaciones a lo estrictamente necesario, para no alterar la microbiota del suelo.

9- BIBLIOGRAFÍA

- ACCINELLI, C.; KOSKINEN, J.; SEENBINGER, A.; PARTY, A.; SADOEWSKI, M. 2005. Effects of Incorporated Corn Residues on Glyphosate Mineralization and Sorption in Soil. *Applied Soil Microbiology and Biochemistry. J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53 (10), pp 4110–4117
- ALBERS, C.; BANTA, G.; HANSEN, P.; JACOBSEN, O. 2009. The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil- Comparing different soils and humic substances. *Environmental Pollution* 157: 2865- 2870.
- ALEF, K. 1995. Soil respiration. In: Alef, K., Nannipieri, P. (eds). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. London, Academic Press. pp. 214-219.
- ALEF, K. 1998. Estimation of the hidrolisis of fluorescein diacetate. In: Alef, K. Y Nannipieri, P. (eds). *Methods in Applied soil. Microbiology and Biochemistry*. London, Academic Press. pp.232-233.
- ALEXANDER, M. 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* 211: 132- 138.
- ALLETTO, L., COQUET, Y., BENOIT, P., BERGHEAUD, V. 2006. Effects of temperature and water content on degradation of isoproturon in three soil profiles. *Chemosphere* 64: 1053-1061.
- ALLETTO, L., COQUET, Y., BENOIT, P., BERGHEAUD, V. 2008. Temperature and water pressure head effects on the degradation of the diketontrile metabolite of isoxaflutole in loamy soil under two tillage systems. *Environmental Pollution* 156: 678-688.
- AL RAJAB, A.; SCHIAVON, M. 2005. The retention of glyphosate in differents three agricultural soils. 35th Congress of French Group of Pesticides (35th, 18-20 Mai 2005, Marne-La-Vallée (France). Communication oral.
- AL RAJAB, A.; AMELLAL, S.; SCHIAVON, M. 2008. Sorption and leaching of C14-glyphosate in agricultural soils. *Agronomy for Sustainable Development* 28: 419-428.

- ALVAREZ, C.; ALVAREZ, R.; GRIGERA, M.; LAVADO, R. 1997. Associations between organic matter fractions and the active soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 767-773.
- ANDERSON, J. 1982. Soil respiration. In: Page, A.L. (Ed). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. 2nd. ed. Madison, WI, ASA-SSSA. pp. 837-871.
- ANDERSON, T. 2003. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 98: 285-293.
- ANDREA, M.; PETTINELLI, J. 2000. Efeito de applicacoes de pesticidas sobre a biomassa e a respiracao de microorganismos de solos. *Arquivo Instituto Biológico, Sao Paulo* 67: 223-228.
- ANDREA, M.; PERES, T.; LUCHINI, L.; BAZARIN, S.; PAPINI, S.; MATALLO, M.; SAVOY, V. 2003. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesq. agropec. bras.* vol.38 no.11 Brasilia Nov. 2003
- ANDRIAMI, J. 1997. Uso del agua y del riego. En: *El cultivo de soja en Argentina*. Córdoba, Giorda y H. Baigorr. pp.143-150.
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultado em: 14 fev. 2007. Online. Disponível na Internet em: <<http://www.anvisa.gov.br>>.
- ARAÚJO, A.; MONTEIRO, R.; ABARKELI, R. 2003. Effect of glyphosate on microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere, Oxford*. 52: 799-804.
- ARRIETA, A.; MESQUIDA, M. 1996. Efecto del control químico en el crecimiento y potencial reinfestación del *Solanum sisymbriifolium* en soja. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Facultad de Agronomía. 44p.
- ARREGUI, M.; LENARDON, A.; SANCHEZ, D.; MAITRE, M.; SCOTA, R.; ENRIQUE, S. 2003. *Pest Management Science* 60: 163.
- ASTAZARIAN, G.; CERETTA, S. 1984. Control de malezas en sorgo, maíz, girasol y soja en siembra directa sobre rastrojo de trigo. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Facultad de Agronomía. 208p.

- ATLAS, R.; BARTHA, R. 2002. Ecología microbiana y Microbiología ambiental, 4^a ed. Madrid, Pearson. 696p.
- BAIGORRI, H. 2004. Criterios generales para la elección y el manejo de cultivares en el cono sur. In: Díaz- Zorita y Duarte (Ed). Manual práctico para la producción de soja. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. pp. 39-77.
- BAKER, H. 1974. The evolution of weeds. Annual Review Ecology and Systematics 5: 1-24.
- BENTLEY, R. 1990. The shikimate pathway- a metabolic tree with many branches. Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology 25: 307-324.
- BERGSON, A.; DE RIZZO, M. 2008. Desenvolvimento e validacao de metodo de analise de glifosato em graos de soja. Quimica Nova 31(1): 5-9.
- BLUM, A.; NARBONDO, I.; OYHANTCABAL, G.; SANCHO, D. 2008. Soja transgénica y sus impactos en Uruguay. La nueva colonización. Montevideo, RAP-AL Uruguay. 194p.
- BOHM, G.; GENOVESE, M.; PIGOSSO, G.; TRICHEZ, D.; ROMBALDI, C. 2008. Residuos de glifosato e ácido amonometilfosfonico e teores de isoflavonas em soja BRS 244 RR and BRS 154. Ciencia Tecnologia Alimentos, Campinas, 28 (Supl.): 192-197, dez.
- BORJESSON, E.; TORSTENSSON, L. 200. BLUM, A.; NARBONDO, I.; OYHANTCABAL, G.; SANCHO, D. 2008. Soja transgénica y sus impactos en Uruguay. La nueva colonización. A, p 886, 2007.
- BOYD, S; MORTLAND, M. 1990. Enzyme interactions with clays and clay organic matter complexes. En: Bollag, J.M. y Stotzki. G. (eds) Soil Biochemistry. New York, Marcel Dekker. v.6, pp.1-28
- BRAJA, B.; y ALFONSO, D. 2005. Amonimethylphosponic acid and glyphosate adsorption onto goethite: a comparative study. Environmental Science and Tecnology, 39: 585-592.
- BRAUSCH, J.; BRALI, B.; SMITH, P. 2007. Acute and sub-lethal toxicity of three POEA surfactant formulations to Daphnia magna. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology 78: 510-514.

- BROMILOW, R.; EVANS, A.; NICHOLS, P.; TODD, A.; BRIGGS, G. 1996. The effect on soil fertility of repeated applications of pesticides over 20 years. *Pesticide Science* 48: 63-72.
- BROMILOW, R.; EVANS, A.; NICHOLS, P.; 1999. Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soil types: 2. Field studies. *Pesticide Science* 55: 1135- 1142.
- BROOKES, P. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biological and Fertility of Soils* 19: 269-279.
- BRUSSAARD, L., DE RUITER, P.C., BROWN, G.G. 2007. Soil biodiversity for *agricultural* sustainability. *Agriculture Ecosystem & Environment* 121: 233-244.
- BURGER, M.; FERNANDEZ, S. 2004. Exposición al herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos. *Revista Médica del Uruguay* 20: 202-207. Consultado 20 agosto de 2007. Disponible en: <http://www.rmu.org.uy/revista/2004v3/art6.pdf>:
- BUSSE, M.; RATCLIFF, A.; SHESTAK, C.; POWERS, R. 2001. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1777-1789.
- CALDERON, M.; QUINTANA, M.; LOPEZ, HERMOSIN, C. 2005. Estudio preliminar sobre el comportamiento del herbicida glifosato en dos suelos de Extremadura. Sevilla, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología.
- CARLISLE, S.; TREVORS, J. 1986. Effect of the herbicide glyphosate on respiration and hydrogen consumption in soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 27: 391-401.
- CARLISLE, S.; TREVORS, J. 1988. Glyphosate in the environment. *Water Air Soil Poll.* 39, 409-420 on respiration and hidrogen consumption in soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 27: 391-401.
- CEREJEIRA, M. 2007. Curso de Tecnologia Pós-Colheita e Processamento Mínimo de Produtos Hortifrutícolas Qualidade e Segurança Pesticidas e Segurança Alimentar. Disponible en: Http://www.isa.utl.pt/files/pub/ensino/formacao/TPC_Comunicacoes/Dia01/04_Pesticidas_MJCerejeiraVF.pdf.

- CHEA, U.; KIRWOOD, R.; LUM, K. 1998. Degradation of four commonly used pesticides in Malaysian agricultural soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:1217-1223.
- CHAER, G.; TOTOLA, M. 2007. Impacto de manejo de residuos organicos durante a reforma de plantios de eucalipto sobre indicadores de qualidade do solo. *Revista Brasileira Ciencia do Solo* 31(6):1381-1396.
- CHRISTY, S.; KARLANDER, E.; PAROCHETTI, J. 1981. Effects of glyphosate on the growth rate of *Chlorella*. *Weeds Science* 29: 5-7.
- CASSARINO, J. 1974. Análisis agroeconómico y posibilidades del cultivo de soja en el Uruguay. Tesis Ing. Agr. Montevideo. Uruguay. Facultad de Agronomía. 66 p.
- COGGINS, J. 1989. The shikimate pathway as target for herbicides and fungicides. In: Dodge, A.D. (Ed.), *Herbicides and plant metabolism*. Society for Experimental Biology. Seminar Series 38. pp. 97-112.
- COLLINS, H.; ELLIOT, R.; RICKMAN, D.; BEZDICEK, F.; PAPENDICK. 1990. Wheat straw decomposition and changes in decomposition ability during field exposure. *Soil Science Society of America Journal* 54: 1013-1016.
- COMISION INTERSECRETARIAL PARA EL CONTROL DEL PROCESO Y USO DE PLAGIUCIDAS, FERTILIZANTES Y SUSTANCIAS QUIMICAS (CICOPLAFEST), 1998. Características físico químicas de los plaguicidas y su transporte. Consultado el 5 de octubre de 2006. Disponible en : <http://www.ine.gob.mx/dgicurg/plaguicidas/>
- CONAMA (2001) Geotecnica: Diagnostico de la Gestión Integral de la Cuenca del Cachapoal, VI Región. Informe final. Stgo de Chile.
- COUPLAND, D.; CASELEY, J. 1979. Presence of C14 activity in root exudates and guttation fluid from *Agropyron repens* treated with carbono14 –labeled glyphosate. *New Phytologist* . 83: 17-22.
- COUPLAND, D.; LUTMAN, P.1982. Investigations into the movement of glyphosate from treated to adjacent untreated plants, *Annals of Applied Biology* 101: 315-321.
- COWELL, J; NORD, S.1989. Manual of pesticide residues analysis. Pesticides Comission, Deutsche Forschungsgemeinschaft ; DFG. v.2

- COX, C. 1995. Glyphosate. 2. Human exposure and ecological effects. Journal of pesticide reform: a publication of the Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides 15 (4): 14-20.
- CRESPO, J.; LONGINOTTI, J. 1988. Alternativas de manejo en el cultivo de soja. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Facultad de Agronomía. Uruguay.
- CUJO, J.; MARTINEZ, H. 2001. Evaluación de alternativas para el control químico de malezas en soja (*Glicine max*) bajo el régimen de cero laboreo. Tesis Ing. Agr. Montevideo. Facultad de Agronomía. Uruguay.
- DALAL, R. 1998. Soil microbial biomass- what do the numbers really mean? Australian Journal of Experimental Agriculture 38: 649-665.
- DELLACIOPPA, G.; BAUER, B. KLEIN.; D.; SHAH, R.; FRALEY.; G. KISHORE. 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. Proceedings National Academy Science USA. 83: 6873-6877.
- DE-NEVE, S.; PANNIER, J.; HOFMAN, G. 1996. Temperature effects on C- and N-mineralization from vegetable crop residues. Plant Soil 181: 25-30.
- DICK, R.; QUINN, J.; 1995. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. Applied Microbiology Biotechnology. 43(3): 545-550.
- DINHAM, B. 1998. Resistance to glyphosate. Pesticides News 41: 5.
- DOMSCH, K., JAGNOW, G.; ANDERSON, T. 1983. An ecological concept for the assessment of side effects of agrochemicals on soils microorganisms. . Residue Reviews 86: 65- 105.
- DOMMERGUE, S.; MANGENOT, F., 1970. Ecologie microbienne du sol. Paris, Masson and Cie. 796 p.
- DOOREMBOS, J.; KASSAM, A.; BENTVELSEN, C.; BANSCHIED, V.; PLUSE, J.; SMITH, M.; UITTENBOGAARD, G.; VEN DER VAL, H. 1980.Efectos del agua sobre el rendimiento de los cultivos. Roma, FAO. 212p. (Estudio FAO Riego y Drenaje no.33)

- DOUBLET, J.; BARRIUSO, E. 2009. Delayed degradation in soil of foliar herbicides glyphosate and sulcotrione previously absorbed by plants: Consequences on herbicide fate and risk assessment. *Chemosphere* (online), doi:10.1016/j.chemosphere.2009.06.044.
- DOUGLAS, J.; KRUEGER, J. 1991. Microbial transformations of herbicides and pesticides. *Advances in applied microbiology* 36: 1-66.
- DOUGLAS, C.; RICKMAN, W. 1992. Estimating crop residue decomposition rating from air temperature, initial nitrogen content and residue placement. *Soil Science Society America Journal* 56:272-278.
- DURAN, A. 1985. *Los suelos del Uruguay*. Montevideo, Hemisferio Sur. 398 pp.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (Washington, United States). Registration eligibility decision (RED): glyphosate. Available at: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/old-reds/glyphosate.pdf>>Accessed in: Feb.07, 2003.
- ERIKSSON, K.; 1975. Roundup. *Weeds and weeds Control*. 16: 15-6.
- ERNST, O; CASTTIGLIONI, E. 2004. *La soja en el sistema agrícola uruguayo*. Revista Cangüé (Uruguay) no. 26: 7-9.
- EXTTOXNET, 1996. Glyphosate. Pesticide Information Profiles. Extension Toxicology Network. Disponible en: <http://www.google.com.uy/search?hl=es&q=EXTTOXNET+Roundup&meta=s>
- FENG, J.; THOMPSON, D. 1990. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. 2: persistence in foliage and soils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 38: 1118-11125.
- FERNANDEZ, G. 2007. Efeitos de herbicidas na microbiota do solo em sistema fechado. Tesis Doctorado. Jaboticabal, Sao Paulo, Brasil, Universidad de Estadual Paulista. 60p.
- FERREIRA, E.; SANTOS, J.; SILVA., A; VARGAS, Le REIS, M.R. 2006. Glyphosate no controle de biotipos de azévem e impacto na microbiota do solo. *Planta Daninha* , Vicosa-MG 24(3): 573-578.
- FIERER, N; SCIMEL, J.; HOLDEN, P.; 2003a. Variations in microbial community composition trough two soil depth profiles. *Soils Biology and Biochemistry* 35: 167-176.

- FIERER, N.; ALLEN, A.; SCHIMEL, J.; HOLDEN, P.; 2003b. Controls on microbial CO₂ production: a comparison of surface and subsurface soil horizons. *Global Change Biology* 9: 1322-1332.
- FILIP, Z. 2002. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 88:169-174.
- FRANZ, J. E; MAO, M. K., SIKORSKI, J. A., 1997. Glyphosate: a unique global herbicide. Washington, DC, American Chemical Society. 653p. (American Chemical Society Monograph 189)
- FRAZIER, D.; Mc COLL, J.; POWERS, R. 1990. Soil nitrogen mineralization in a clearcutting chronosequence in a northern California conifer forest. *Soil Science Society of America Journal* 54: 1145-1152.
- FRIONI, L. 1999. Procesos microbianos. Córdoba, Argentina, Fundación Universidad Nacional de Río IV. 332p
- FRIONI, L. 2006. Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Montevideo, Facultad de Agronomía. 464 p.
- GARCIA PRECHAC, F. 1998. Siembra Directa de Pasturas. In: 2º Seminario Internacional de Actualización Técnica. Siembra Directa (2o., Rivera – Livramento; 20-22 agosto 199). Diskette con artículos.
- GERRITSE, R.; BELTRAN, J.; HERNANDEZ, F. 1996. Adsorption of atrazine, simazine, and glyphosate in soils of the Gnangara Mound, Western Australia. *Australian Journal Soil Research* 34: 599-607.
- GHASSEMI, M.; FARGO, P.; PAINTER, S.; QUINLIVAN, R.; SCOFIELD, TAKATA, B. 1981. Environmental fates and impacts of major forest use pesticides. Washington D.C., U.S. EPA. Office of pesticides and Toxic Substances. p. A-149-168.
- GIANFREDA, L. 1995. Activity of free and immobilized urease in soil: effects of pesticides. *Soil Biology & Biochemistry*. 26 (6): 777-784.

- GIL-SOTRES, C.; TRASAR-CEPEDA, M.; LEIROS, C.; SEONE, S. 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. Soil Biology and Biochemistry 37: 877-887.
- GILLER, K. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. Applied Soil Ecology 6: 3-16.
- GLASS, R. 1987. Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals. Journal of Agriculture and Food Chemistry 35: 497-500.
- GLUSCAZAK, L.; DOS SANTOS, D.; SILVEIRA, B.; RODRIGUES, R.; CHITOLINA, M.; MORSCH, V.; LORO, V. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C 146: 519–524
- GONCALVES DE ABREU, A. B.; RIZZO DA MATTA, M. H., 2007. Desenvolvimento e validacao de metodo de análise de glifosato em graos de soja. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijaoComumRO/daninhas.htm>, acessada em Janeiro 2007
- GROSSBARD, E; HAZEL, A. 1976. Specific microbial responses to herbicides. Weed Research 16: 163-169.
- HANCE, R. 1976. Adsorption of glyphosate by soils. Pesticide Science .7:363-366
- HANEY, R.; SENSEMAN, S.; HONS, F.; ZUBERER, D. 2000. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. Weed Science 48: 89-93.
- HANEY, R.; SENSEMAN, S.; HONS, F. 2002. Effect of Roundup Ultra on Microbial Biomass from Selected Soils. Journal of Environmental Quality 31: 730-735.
- HART, M.; BROOKES, P. 1996. Soil microbial biomass and mineralisation of soil organic matter after 19 years of cumulative field applications of pesticides. Soil Biology and Biochemistry 28:1641- 1649.
- HEINONEN-TANSKI, H. 1989. The effect of temperature and liming on the degradation of glyphosate in two arctic forest soils. Soil Biology and Biochemistry 21: 313-317.

- HETHERINGTON, P. 1999. The absorption, translocation and distribution of the herbicide glyphosate in maize expressing the CP-4 transgene. *Journal of Experimental Botany* 50: 1567-1576.
- HOFMAN, J. 2003. Research of the soil microorganism at the biomass process and community-levels. Disponível em: <http://recetox.muni.cz>. Acesso em abril 2006.
- JACKSON, L.; PASCUAL, U.; BRUSSAARD, L.; DE RUIER, P.; KAMALJIT, S.; BAWA, K. 2007. Biodiversity in agricultural landscapes: Investing without losing interest. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 121(3):193-195.
- JAMA, B.; NAIR, R. 1996. Decomposition and nitrogen-mineralization patterns of *Leucaena Leucocephala* and *Cassia siamea* mulch under tropical semiarid conditions in Kenya. *Plant Soil* 179: 275-285.
- JENKINSON, D.; POWLSON, D. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 8:209–213.
- JENKINSON, D.; LAAD, J. 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: Paul, E.A., Ladd, J.N. (Eds.), *Soil Biochemistry*. New York, Marel Dekker. V.5;pp.415-417
- JENNINGS, D.H. 1995. *The physiology of fungal nutrition*. Cambridge, UK., Cambridge University Press. 640p.
- JOHAL, G.; RAHE, J. 1984. Effect of soilborne plant-pathogenic fungi on the herbicidal action of glyphosate on bean seedlings. *Phytopathology* 74: 950-955.
- JORDAN, T. 1981. Effects of diluent volumes and surfactans on the phytotoxicity of glyphosate to bermudagrass (*Cynodon dactylon*). *Weed Science* 29:79-83.
- JORDAN, D.; KREMER, R.; BERGFELD, W.; KIM, K; CACNIO, V. 1995. Evaluation of microbial methods as potential indicators of soil quality in historical agricultural fields. *Biology and Fertility of Soils* 19: 297-302.
- KANTOLIC, A.; SATORRE, E. 2004. Elementos centrales de la ecofisiología del cultivo de soja. In: Díaz-Zorita y Duarte (Ed.) *Manual práctico para la producción de soja*. Buenos Aires, Argentina, Hemisferio sur pp.19-37.

- KILLHAM, K. 1985. A physiological determination of the impact of environmental stress on the activity of microbial biomass. *Environmental Pollution* 38: 283- 294.
- KINEY, C.; MANDERNACK, K.; MOISER, A. 2005. Laboratory investigations into the effects of the pesticides mancozeb, chlorotalonil, and prosulfuron on nitrous oxide and nitric oxide production in fertilizer soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 837-850.
- KIRWOOD, R. 1979. *Advances in Pesticide Science*. Geissbuhler, H. Ed. Oxford, Pergamon Press. pp 420-429.
- KISHORE, G.; JACOB, G. 1987. Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine intermediate. *Journal of Biological Chemistry* 262 (25):12164-8.
- KOLLMAN, W.; SEGAWA. J. 1995. Interim report of the pesticide chemistry database. Environmental hazards Assesment Program. Department of Pesticide Regulation.
- KRZYSKO-LUPICKA, H. 1997. The use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide. *Chemosphere* 34: 2601- 2605.
- KUNCB, F., TICHY, P., VANCURA, V. 1985. 2, 4-dichlorophexoxy acetic acid in the soil: mineralization and changes in the counts of bacteria decomposers. Versailles, INRA. pp.15 (Publ. Les Colloques de l'INRA, No. 31).
- LINDER, P. J.; MITCHELL, J.W.; FREEMAN, G. D. 1964. Persistence and translocation of exogenous regulating compounds that exude from roots. *Journal Agricultura. Food Chemistry* 12: 437-438.
- LIPHADZI, K.; KHATIB, C.; BENSCH, P.; STHALMAN, J.; DILLE, T.; RICE, C.; HORAK, G. 2005. Head, soil microbial and nematode communities as affected by glyphosate and tillage practices in a glyphosate-resistant cropping system. *Weed Science* 53:536- 545.
- LIU WEN-TSO, TERENCE, L. MARSH, HANS CHENG.; LARRY J. FORNEY. 1997. Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4516-4522.

- MAQUEDA, C.; MORILLO, L.; UNDABEYTIA, T.; MARTIN, F. 1998. Sorption of glyphosate and Cu on natural fulvic acid complex: mutual influence. *Chemosphere* 37 (6): 1063-1072.
- MCWHORTER, C.; Y AZLIN, W. 1978. Effects of environment on the toxicity of glyphosate to Johnson grass (*Sorghum halepense*) and soybeans (*Glycine max*). *Weed Science* 26: 605-608.
- MCBRIDGE, M. 1991. Electron spin resonance study of copper ion complexation by glyphosate and related ligands. *Soil Science Society America Journal*. 55:979-985.
- MGAP, 2005. Manual de Capacitación para el buen uso y manejo de plaguicidas en Uruguay. Montevideo, 205p.
- MARTINO, D. 1995. El Herbicida Glifosato: su manejo más allá de la dosis por hectarea. INIA La Estanzuela. Serie técnica N° 61.
- MARTINO, D. 1997. Siembra directa en los sistemas agrícola ganaderos del litoral.- INIA La Estanzuela. Serie Técnica N° 82,
- MARZOCCA, A., 1976. Manual de malezas. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 553p.
- MELERO, S.; RUIZ PORRAS, J.; HERENCIA, J.; MADEJON, E. 2006. Chemical and biochemical properties in a silty loam soil under conventional and organic management. *Soil Tillage Research*. 90 (2006):162-170.
- MIJANGOS, I.; BECCERIL, J.; ALBIZU, I.; EPELDE, L.; GARBISU, C. 2009. Effects of glyphosate on rhizosphere soil microbial communities under two different plant compositions by cultivation-dependent and independent methodologies. *Soil Biology and Biochemistry*: 41: 505-513
- MILLES, C.; MOYE, H. 1988. Extraction of glyphosate herbicide from soil land clay minerals and determination of residues in soils. *Journal Agricultural Food Chemistry* 36: 486-491
- MOORMAN, J. 1989. A review of pesticide effects on microorganisms and microbial processes related to soil fertility. *Journal of Production Agriculture*, 21:14-23.

- MOREIRA, F.; SIQUIERA, J. 2002. Xenobióticos no solo. In: MOREIRA, F. M.S.; SIQUIERA, J. O. Microbiología e bioquímica do Solo. Lavras: UFLA. pp. 243-284.
- MUYZER, G. y SAMALLA, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141
- MUYZER, G.; WAAL, C.; UITTERLINDEN, A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gel electrophoresis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied environmental Microbiology* 59: 695-700
- NANNIPIERI, P.; KANDELER, E.; RUGGIERO, P.; 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (eds), *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*. Marcel Dekker Inc. pp. 1-33.
- NANNIPIERI, P. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54: 665-670.
- NANNIPIERI, P. 1994. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: Pankhrast, C.E., Doube, B.M., Gupta.V.V.S.R., P.R. (Eds), *Soil biota: management and sustainable farming systems*. Melbourne, Australia, CSIRO. pp. 233-244.
- NELSON, D; COX, M. 2005. *Principios de bioquímica*. 4a.ed. S.A. Barcelona. España, OMEGA. 1119p.
- NSABIMANA, D.; HAYNES, R.; WALLIS, F. 2004. Size, activity and catabolic diversity of the soil microbial biomass as affected by land use. *Applied Soil Ecology* 26: 81-92.
- OBOJSKA, A.; LEJCZAK, B.; KUBRAK, M.. 1999. Degradation of phosphonates by streptomycetes isolates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:872-876.
- OBOJSKA, A., TERNAN, N., LEJCZAC, B., KAFARSKI, P., Mc MULLAN, G. 2002. Organophosphate utilization by thermophile *Geobacillus caldoxylosilyticus* T20. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2081-2084.

- PERUZZO, P.; PORTA, A.; RONCO, A. 2008. Levels of glyphosate in surface Waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156:61-66.
- PESSAGNO, R.; ROSA, M.; TORRES, M; DOS SANTOS, A. 2008. Glyphosate behavior at soil and mineral-water interfaces. *Environmental Pollution* 153: 53-59.
- PETERSEN, I.; BRUUN, H.; RAVN, H.; SORENSEN, J.; SORENSEN, H. 2007. Metabolic effects in rapessed (*Brassica napus* L.) seedlings alter root exposure to glyphosate. *Pesticide Biochemisry and Physiology* 89: 220-229.
- PICCOLO, A; CELANO, G.; ARIENZO, M.; MIRABELLA, A. 1994. Adsorption and dessorption of glyphosate in some Europeans soils. *Journal Environmental and Science Healt* 6:1105-
- PICCOLO, A.; CELANO, G; CONTE, P. 1996. Adsorption of Glyphosate by Humic Substances. *J.Agric.Food Chem.* 44: 2442-2446.
- PICCOLO, A; CELANO, G.; ARIENZO, M.; MIRABELLA, A. 1994. Adsorption and dessorption of glyphosate in some Europeans soils. *Journal Environmental and Science Healt* 6:1105
- PRATA, F.; LAVORENTI, A; REGITANO, J.; TORNISIELO, V. 2000. Influencia da material orgánica na sorcao e dessorcao do Glifosato em solos com diferentes atributos mineralógicos. *Revista Brasileira de Ciencias do solo* 24:947-951.
- PRATA, F.; CAMPONEZ, V.; LVORENTI, A.; TORNISIELO, V.; BORGES, J. 2003. Glyphosate sorption and desorption in soils with distinct phosphorus levels. *Scientia Agricola* 60(1)
- PRIMER SIMPOSIO NACIONAL DE AGRIULTURA DE SECANO. 2009. Faculta de Agronomía – UDELAR, IPNI Cono Sur
- POWELL, J.; CAMPBELL, R.; DUNFIELD, K.; GULDEN, R.; HART, M.; LEVY, D.; KLIRONOMOS, J.; PETER, K.; SWANTON, C.; TREVORS, J.; ANTUNES, P. 20009. Effect of glyphosate on the tripartite symbiosis formed by *Glomus inraradices*, *Bradyrhizobium japonicum*, and genetically modified soybean. *Applied soil ecology* 41 : 128-136.

- POWSLSON, D.; BROOKES, P.; CHIRSTEN, B. 1987. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford 19: 159-164.
- QUINN, J., PEDEN, J., DICK, R., 1988. Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29: 511- 516.
- RAIESI, F. 2006. The conversion of overgrazed pastures to almond orchards and alfalfa cropping Systems may favor microbial indicators of soil quality in Central Iran. *Science Direct*. 121: 309-318
- RAIESI, F. 2007. The conversion of overgrazed pastures to almond orchards and alfalfa cropping systems may favor microbial indicators of soil quality in Central Iran. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 121: 309-318
- RACTILIFF, A.W.; BUSSE, M.; AHSTAK, C.J., 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology* 34: 114-124.
- RAMPOLDI, A.; HANG, S.; BARRIUSO, E. 2008. Glyphosate mineralization: Effect of temperature and soybean and corn crop residues. *Chilean journal of agricultural research* 68 (1): 13-20.
- REDDY, K.; RIMANDO, A.; DUKE, S. 2004. Aminomethylphosphonic Acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52: 5139-5143.
- REDDY, K.; RIMANDO, A.; DUKE, S.; NANDULA, V. 2008. Aminomethylphosphonic Acid accumulation in plant species treated with glyphosate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56 (6): 2125-30.
- RELYEA, R. 2005. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications* 15: 1118- 1124.
- ROBERTS, T.; HUTSON, H.; LEE, P.; NICHOLLS, P.; PLIMMER, J. 1998. Metabolic pathways of agrochemicals. Part 1: Herbicides and plants growth regulators. London: The Royal Society of Chemistry. pp. 386-400.

- RODRIGUES, B.; ALMEIDA, F. 1995. Guía de herbicidas. Londrina: Instituto Agronómico do Paraná. 675p.
- ROSADO, A.; DUARTE, G.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. 1997. Molecular microbial ecology: a minireview. *Revista de Microbiología* 28: 135-147.
- ROSEELLO- MORA, R.; AMANN, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbial Ecology* 42:56-68.
- ROSLYCKY, E., 1982. Glyphosate and the response of the soli microbiota. *Soil Biology and Biochemistry* 14, 87-92.
- ROVER, M, KAISER, E.; 1999. Spatial heterogeneity within the plough layer: low and moderate variability of soil proprieties. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 93- 104.
- RUEPPEL, M.; BRIGHTWELL, B.; SCHAEFER, J; MARVEL, J. 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal Agriculture and Food Chemistry* 25: 517-528
- SANNINO, F.; GIANFREDA, L. 2001. Pesticide influence on soil enzymatic activities. *Chemosphere*.45: 417-425.
- SCARLATTO, G.; BUXEDAS, M.; FRANCO, J.; PERNAS, A.; 2001. Siembra directa en la década en la agricultura del litoral oeste uruguayo. Adopción y demandas de investigación y difusión en siembra directa. Serie FPTA 06, INIA. 133p.
- SCHNÜRER, J.; ROSSWALL, T. 1982. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter. *Applied Environmental Microbiology* 43: 1256–1261.
- SHAW, L.; BURNS, R. 2006. Enzyme activity profiles and soil quality. In: Bloem, J., Hopkins, D.; Benedetti, A. (Eds). *Microbiological Methodos for Assessing Soil Quality*. Wallingford, UK, CABI Publishing, pp. 158-171.
- SHINNER, F.; OHLINGERS, R; KANDELER, E; MARGESIN, R. 1996. *Methods in Soil Biology*. Berlin, Springer-Verlag.

- SHUETTE, J. 1998. Environmental Monitoring and Pest management. Sacramento, CA, Department of Pesticide Regulation. 95824-5624
- SILVA, C.; FAY, E.; VIERA, R. 2005. Efeito dos fungicidas metalaxil e fenarimol na microbiota do solo. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicología e meio ambiente (Curitiba)* 15: 93-104.
- SIMONSEN, L.; FOMSGAAR, B.; SVENSMARK, B.; SPLIID, N. 2008. Fate and availability of glyphosate and AMPA in agricultural soil. *Journal of Environmental Science and Health B.* 43: 365-375.
- SORENSEN, P.; LAD, N.; AMATTO, M. 1996. Microbial assimilation of C14 of ground and unground plant materials decomposing in a loamy sand and a clay soil. *Soil Biology and Biochemistry.* 28:1425-1434.
- SORENSEN, P.; SCHULTZ, A.; JACOBSEN, O.; AAMAND, J. 2006. Sorption, desorption and mineralization of the herbicides glyphosate and MCPA in samples from two Danish soil subsurface profiles. *Environmental Pollution* 141: 184- 194.
- SPARLING, G.; 1992. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon is sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research* 30: 195-207.
- SPRANKLE, W., MEGGIT; D. PENNER. 1975. Rapid inactivation of glyphosate in the soil. *Weed Science.* 23:235.
- STAT SOFT. 1999. *Statística for windows*, Tulsa, Stat soft Inc. <http://www.stat soft.com>
- STENROD, M; CHARNAY, M.; BENOIT, P; EKLO, O.. 2006. Spatial variability of glyphosate mineralization and soil microbial characteristics in two Norwegian sandy loam soils as affected by surface topographical features. *Soil Biology and Biochemistry.* Oxford: 38. p.
- SUETT, D. L y JUKES, A. A 1988. Evidence and implications of accelerated degradation of aldicarb and its oxidation products in previously treated soils. *Crop Protection* 9: 44-51.
- TAIWO. L.; OSO, B. A. 1997. The Influence of some pesticides on soil microbial flora in relation to changes in nutrient level, rock phosphate solubilization and P-release under laboratory conditions. *Agriculture. Ecosystem & Environment* 65: 59-68,

- TEJADA, M. 2009. Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate + diflufenican herbicides. *Chemosphere* 76:365-373.
- TELLEZ, V. (2002) Propuesta metodológica para determinar áreas de influencia de fuentes contaminantes de recursos hídricos mediante la aplicación del sistema de Información geográfica en la IX Región. Proyecto para optar al grado de licenciado en medicina veterinaria, Stgo – Chile. Universidad Mayor. 133 pp.
- THORNTHWAITE, C.; MATHER, J. 1995. The water balance. Centerton, N.J. Laboratory of climatology.
- TORSTESSON, L. 1985. Behaviour of glyphosate in soils and its degradation. En: The herbicide glyphosate (Grossbard.E; Atkinson D., eds). London, Butterworth. pp.137-149
- TSUI, M.; CHU, L. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparation between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52: 1189-1197.
- TSUI, M.; WANG, W.; CHU, L. 2005. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental. Pollution* 138: 59-68.
- TUFFI SANTOS, L. D. et al. 2005. Exsudacao radicular do glyphosate por *Brachiaria decumbes* e seus efeitos em plantas de eucalipto e na respiracao microbiana do solo. *Planta Daninha* 23:143-152.
- URUGUAY. DGSA, 2006. Consultado en junio de 2006. En línea. Disponible en: <http://chasque.apc.org/dgsa>
- URUGUAY. DIEA – MGAP. 2007. Encuesta Agrícola Primavera 2007. En línea. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/DIEA>
- URUGUAY. DIEA – MGAP. 2009. Anuario Estadístico Agropecuario 2009. En línea. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/DIEA>
- USDA. 1984. Forest Service. Pesticide background Statements.p.61-672. In USDA:Agriculture Handbook N° 633. Vol.1. Herbicide. Part 2.

- U.S. EPA. 1986. Guidance for the registration of pesticide products containing glyphosate . Washington , D.C.: Office of Pesticide Programs.
- VARGAS, L. 2005. Alteracao das características biológicas dos biotipos de azéveo (*Lolium multiflorum*) ocasionada pela resistencia ao herbicida glyphosate. *Planta Danhina* 23: 153-160.
- VEIGA, F.; ZAPATA, J.; FERNANDEZ, M.; ALVAREZ, E. 2001. Dynamics of glyphosae and aminomethylphosphonic acid in forest soil Galici. *Science of the Total Environment* 271(1-3):135-44.
- VENCILL, W. 2002. *Herbicide Handbook*. 8th ed. Lawrence, KS, USA, Weed Sci. Soc. Amer.,
- VITTA, J. 1997. Manejo y Control de Malezas. CREA, Cuaderno de Actualización Técnica, no. 58. pp.38-47
- WAIWRIGHT, M.1998. A review of the effect of pesticides on microbial activity in soil. *Journal Soil Science* 29: 287-298.
- WARDLE, D.; PARKINSON, D. 1990. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant and Soil* 122: 21-28.
- WARDLE, D.; PARKINSON, D. 1991. Relative importance of the effects of 2,4-D, glyphosate and environmental variables on the soil microbial biomass. *Plant and Soil* 134: 209-219.
- WARDLE, D.; NICHOLSON, K.; RHAMAN, A. 1994. Influence of herbicide applications on the decomposition, microbial biomass, and microbial activity of pasture shoot and root litter. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 37:29-39.
- WARDLE, D. ; GHANI, A. 1995. A critique of the microbial metabolic quotient (qCO_2) as a bioindicator of disturbance ecosystem development. *Soil Biology and Biochemistry* 27: 1601-1619.
- WEAVER, M.; KRUT, L.; ZABLOTOWICH, R.; REDDY, K. 2007. Effects of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Missisipi soil. *Pest Management Science* 63(4): 388-393.

- WEBER, J.; BEST, J.; GONESE, J. 1993. Bioavailability and bioactivity of sorbed organic chemicals. In D.M LINN *et al.*, eds. Sorption and degradation of pesticides and organic chemicals in soil. Madison, WI: American Society of Agronomy And Soil Science Society of America. pp.153-196.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1994. Glyphosate. Geneva, WHO, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 159.)
- WOESE, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51:221-271.
- YACHI, S.; LOREAU, M. 1999. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis *Proceedings of the Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 1463–1468.
- YU, YING.; ZHOU, QI-XING. 2005. Adsorption characteristics of pesticides methamidophos and glyphosate by two soils. *Chemosphere* 58: 811-816.
- ZABALOY, M.; GARLAND, J.; GOMEZ, M. 2008. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2, 4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied Soil Ecology* 40:1-12.
- ZBOINSKA, E., LEJCZAC, B. 1992. Organophosphonate utilization by the wild-type strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 29993-29999.
- ZHOU, D.; WANG, Y.; CANG, L.; HAO, X and LUO X. 2004. Adsorption and desorption of cadmium and glyphosate on two soils with different characteristics. *Chemosphere* 57: 1237-1244.

10. ANEXOS

ANEXO 1.- *Sistemas de producción del cultivo de soja en el Uruguay*

Tres sistemas de producción en los que se desarrolla la soja.

ROTACIONES CULTIVOS - PRADERAS					
1 a 3 AÑOS			3 o 4 AÑOS		
Cultivos agrícolas			Praderas Plurianuales		
AGRICULTURA CONTINUA					
AÑO 1		AÑO 2		AÑO 3	
INVIERNO	VERANO	INVIERNO	VERANO	INVIERNO	VERANO
BARBECHO	Soja 1 ^a	CI	Soja 2 ^a	BARBECHO	Maíz 1 ^a

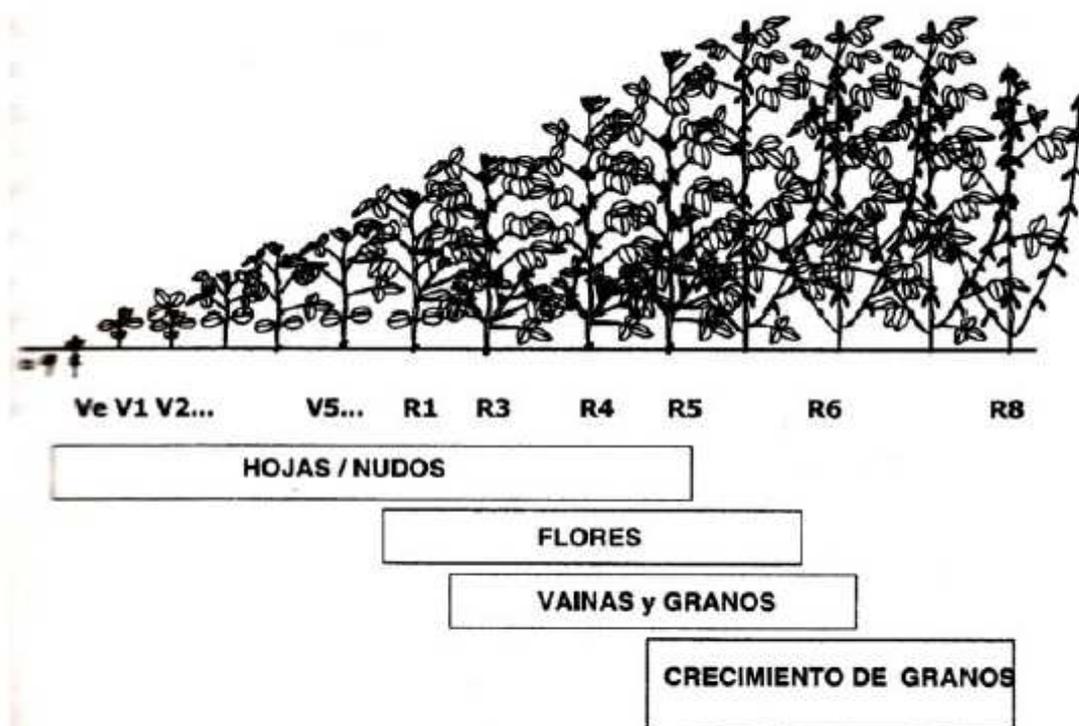
NOTA: CI=cultivo de invierno (trigo, cebada)

SOJA CONTINUA			
AÑO 1		AÑO 2	
INVIERNO	VERANO	INVIERNO	VERANO
BARBECHO	SOJA	BARBECHO	SOJA *

Fuente: Blum, 2008

ANEXO 2.- Ciclo del cultivo de soja

Ciclo del cultivo de soja en la escala de Fehr y Caviness.



Referencia: Ve: emergencia; Vn; estados vegetativos; R1: comienzo de la floración; R3: comienzo de la fructificación; R4: plena floración; R5: comienzo de llenado de granos; R6: pleno llenado; R8: plena madurez.

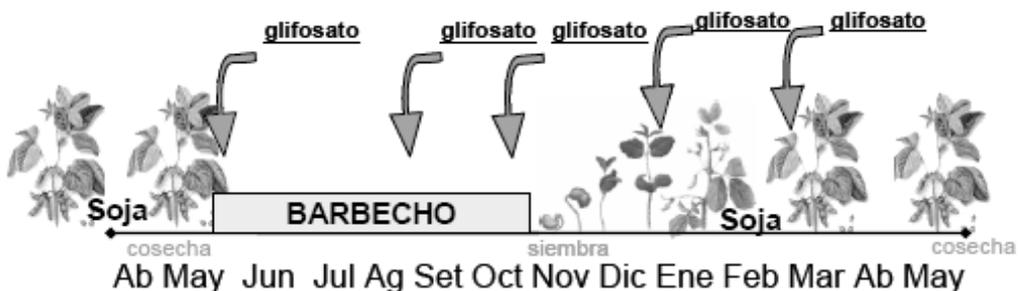
Fuente: Kantolic y Satorre, 2004.

ANEXO 3.- Manejo del glifosato en el cultivo de soja

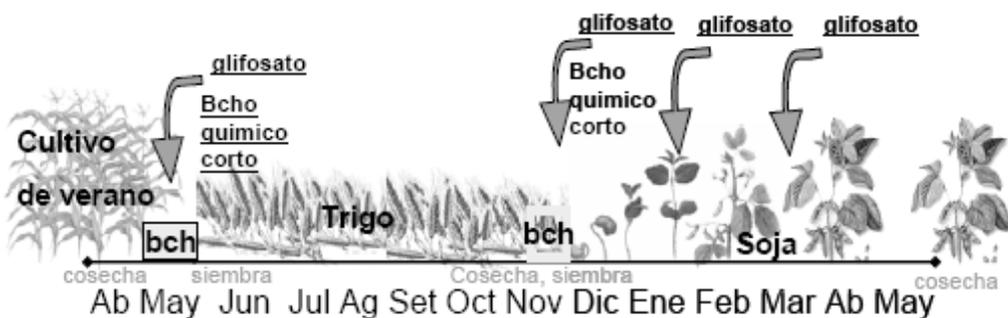
Secuencia de prácticas para sembrar soja después de una pradera.



Secuencia de prácticas para sembrar soja después soja (barbecho largo).



Secuencia de prácticas para sembrar soja después de un cultivo de invierno.



Fuente: Blum, 2008

ANEXO 4.- Propiedades físico-químicas del glifosato

El Glifosato es una solución líquida, clara, viscosa y de color ambarino; normalmente tiene un pH de 4,4 a 4,9 y peso específico de 1,17. Prácticamente inoloro o con un ligero olor a amina; tiene un peso molecular de 169,08 y un punto de fusión de 200°C.

El Glifosato presenta un **alto valor del coeficiente de partición carbono orgánico/agua (Koc)**. Este coeficiente es una medida de la tendencia de un compuesto orgánico a ser adsorbido (retenido) por los suelos o sedimentos. Según Alley (1994), la adsorción de un contaminante se define como la atracción de partículas sobre una superficie de un sólido. El fenómeno inverso de la adsorción es la desorción. La absorción, por otro lado es la incorporación de la partícula dentro de la estructura física del sólido. El Koc es específico para cada plaguicida y sumamente independiente de las propiedades del suelo. El glifosato presenta un elevado lo que indica que una escasa cantidad del glifosato es transportado hacia a las aguas superficiales o a los acuíferos.

El **coeficiente de partición Octanol-agua (Kow)**, es una medida de cómo una sustancia química puede distribuirse entre dos solventes inmiscibles, agua (es un solvente polar) y octanol (es un solvente relativamente no polar que representa a las grasas). El Kow proporciona un valor de la polaridad del plaguicida, que es frecuentemente utilizado en modelos para determinar cómo un plaguicida puede distribuirse en tejido de grasa animal. Los plaguicidas con una vida media alta y un Kow altos pueden acumularse en tejido graso y bioacumularse a lo largo de la cadena alimenticia. El Glifosato presenta **un bajo Kow y una baja solubilidad en grasas** que presenta una baja tendencia a bioacumularse. (Schuette, 1998).

La **volatilidad** de un compuesto representa la tendencia del plaguicida a pasar a la fase gaseosa. Se mide a partir de la **constante de Henry** que depende de la **presión de vapor** en estado líquido y de la solubilidad en agua. Un plaguicida con una alta presión de vapor tiende a volatilizarse y a alejarse del lugar donde se aplicó. La constante de Henry describe la tendencia de un plaguicida a volatilizarse del agua o suelo húmedo. Un valor alto de la constante de Henry indica que un plaguicida tiene un potencial elevado para volatilizarse del suelo húmedo; un valor bajo predice un mayor potencial de lixiviación del plaguicida (EXTOXNET, 1996). La **presión de vapor** del glifosato es **muy baja**; el destino de este herbicida a través de la volatilización es inexistente y no considerándose un contaminante atmosférico (Franz *et al.*, 1997). La **pequeña constante de Henry** en el Glifosato indica que tiende a la partición en el agua vs el aire y es rápidamente adsorbido a las partículas de suelo.

En cuanto a la **solubilidad en el agua**, el glifosato se considera un herbicida **altamente soluble**. Según estudios realizados en Manatoba Canadá (Kirwood, 1979), sugieren que la desaparición del Glifosato en el agua se da a través de la descomposición microbiana o la adsorción por los sedimentos. Ghassemi *et al.*, (1981) concluyen que la tasa de degradación en el agua es menor que en el suelo porque se encuentran menor cantidad de microorganismos en el agua que en la mayoría de los suelos. En EEUU, un estudio de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) analizando el agua de fuentes naturales, el rango de vida media se encontraba entre 35 y 63 días (U.S. EPA, 1986). Para todos los sistemas, el sedimento parece ser la mayor fuente de residuos.

Fotodegradación: la degradación del Glifosato aplicado al suelo por la luz solar parece ser **insignificante**. En condiciones de luz no natural el herbicida tampoco pareció ser intensamente fotodegradable (CICOPLAFEST; 1998).

En el siguiente cuadro se presentan las principales propiedades fisicoquímicas del glifosato.

Cuadro 1: Propiedades fisicoquímicas del glifosato (EXTOXNET, 1996)

Propiedad	Compuesto Puro (ingrediente activo)	Sal de glifosato- Isopropilamonio
Fórmula Molecular	C ₃ H ₈ NO ₅ P	C ₆ H ₁₇ N ₂ O ₅ P
Peso Molecular	169,1 g/mol	228,2 g/mol
Estado físico	Sólido blanco	Líquido viscoso de color
Olor	Inodoro	Prácticamente inodoro,
Densidad	0,5 g/ml	1,160-1,180 g/ml
Punto de Fusión	184,5 °C	No aplicable (estado líquido)
Presión de Vapor	1,84 x 10 ⁻⁷	3x10 ⁻⁷ mm Hg a 15°C
Punto de Ebullición	Se descompone	Se descompone
pH en solución al 1%	2,5	4,7
Solubilidad en agua	12.000 ppm a 25°C	900.000 ppm a 25°C
Otros solventes	Ninguno	Solo soluble en agua
Estabilidad	32 días a 25°C y pH= 5,7 ó	32 días a 25°C y pH= 7 ó 9
Kow	Pow= 24000 ml/g	No determinado
Constante Henry	Menor a 7x 10 ⁻¹¹	No determinado
Corrosividad	No corrosivo	No corrosivo

ANEXO 5.- Factores ambientales existentes en el ensayo, durante la primera, segunda y tercera aplicación del glifosato. Estación Experimental: “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

La volatilización y deriva en la actividad agrícola, son los procesos de mayor importancia en determinar el destino de los fitosanitarios en el ambiente. La deriva es definida como el movimiento del producto en el aire durante y después de la aplicación. Es uno de los procesos de pérdida más importantes de fitosanitarios, especialmente en condiciones de verano, ya que es favorecida por la ocurrencia de baja humedad relativa, alta velocidad del viento y elevada temperatura al momento de la aplicación (Primer Simposio..., 2009) Los principales factores ambientales que afectan la performance del tratamiento con glifosato durante la aplicación son la HR y la temperatura, Con alta HR, las cutículas se hidratan, lo cual facilita la absorción de moléculas hidrófilas como glifosato (Santier y Chamel, 1992). A altas temperaturas, la fluidez de las membranas aumenta, lo que también facilita el pasaje de glifosato. La HR usualmente afecta la performance del glifosato más marcadamente que la temperatura. La tasa de absorción de glifosato está directamente relacionada con la HR. Jordan (1981) evaluó el control de *Cynodon dactylon* con glifosato a diferentes temperaturas y HR. La toxicidad se duplicó cuando la HR pasó de 40 a 100%, independientemente de la temperatura. La toxicidad fue mayor a 32°C que a 22°C cuando la HR era del 40%, pero a 100% no se verificó efecto de la temperatura.

Otro factor relevante que afecta la performance del tratamiento es la velocidad del viento la cual no de sobrepasar los 8 km/hora para evitar la deriva del producto mediante la cual el plaguicida se transporta lejos del área tratada durante la aplicación, pudiendo contaminar a otros cultivos, otros trabajadores u organismos presentes en ecosistemas acuáticos y terrestres (MGAP, 2005)

Aplicaciones de glifosato en el ensayo	Temperatura media del aire (°C)	Humedad media del aire (%)	Velocidad media del viento (km/h)
Primera aplicación 23/10/06	23,2	57	18
Segunda aplicación 20/11/06	17,6	53	11
Tercera aplicación 27/12/06	23,5	57	10

Fuente: Estación meteorológica, Aeropuerto Chalking, Paysandú- Uruguay

ANEXO 6. - *Balance Hídrico según el método de Thornthwaithe y Mather (1955) realizado en el suelo Brunosol Eutrico Típico de la Unidad de suelo San Manuel correspondiente al ensayo en el período octubre de 2006-abril de 2007. La lámina de Agua disponible (almacenaje) en los 7cm superiores del suelo es de 12,1 mm. Estación Experimental: “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).*

AÑO	MES	Días	Deficit	Exceso	ALM%
2006	OCT	1 al 5	0	0	100
		6 al 10	14	0	100
		11 al 15	0	16	100
		16 al 20	15	0	100
		21 al 25	27	0	100
	26 al 31	0	66	100	
	NOV	1 al 5	0	0	100
		6 al 10	2	0	50
		11 al 15	12	0	13
		16 al 20	0	38	100
		21 al 25	12	0	16
	26 al 30	0	0	24	
	DIC	1 al 5	3	0	18
		6 al 10	22	0	2
		11 al 15	16	0	1
		16 al 20	0	57	100
		21 al 25	0	49	100
	26 al 31	13	0	14	
2007	ENE	1 al 5	0	16	100
		6 al 10	23	0	6
		11 al 15	0	0	84
		16 al 20	5	0	33
		21 al 25	25	0	3
	26 al 31	22	0	1	
	FEB	1 al 5	8	0	0
		6 al 10	29	0	0
		11 al 15	39	0	0
		16 al 20	0	7	100
		21 al 25	0	36	100
	26 al 28	0	41	100	
	MAR	1 al 5	0	84	100
		6 al 10	0	25	100
		11 al 15	6	0	32
		16 al 20	0	17	100
		21 al 25	4	0	39
	26 al 31	0	149	100	
	ABR	1 al 5	0	32	100
		6 al 10	0	19	100
		11 al 15	0	0	81
		16 al 20	1	0	57
		21 al 25	0	41	100
	26 al 31	0	0	77	
	MAY	1 al 5	0	124	100

* Agua disponible o Almacenaje como porcentaje de la lámina de 12, 1 mm que constituye el 100% del almacenaje.

ANEXO 7.- *Valores de probabilidades de los efectos estudiados por período de estudio. Estación Experimental: “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).*

Variable	Período 1 (días: 0, 4 y 8 del inicio del experimento)			Período 2 (días: 27, 31 y 37 del inicio del experimento)			Período 3 (días: 64, 70,73 y 80 del inicio del experimento)		
	Trat*	Dm**	Inter***	Trat*	Dm**	Inter***	Trat*	Dm**	Inter***
Biomasa	0.68	0.66	0.74	0.22	0.08	0.77	0.47	0.36	0.76
Respiración	0.35	0.06	0.94	0.46	0.31	0.54	0.10	0.06	0.02
qMic	0.69	0.66	0.74	0.22	0.08	0.77	0.47	0.36	0.76
qM	0.35	0.06	0.94	0.46	0.31	0.54	0.10	0.06	0.02
qCO ₂	0.23	0.20	0.21	0.21	0.13	0.57	0.97	0.69	0.31

* Tratamiento

** Días de muestreo

*** Interacción tratamiento x días de muestreo

ANEXO 8.- *Valores promedio del efecto momento de muestreo para las variables respiración microbiana y Cociente de mineralización del C orgánico (qM) en el primer período de estudio. Estación Experimental: “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).*

Fechas	Resp	qM
0	398 a	86.5 a
4	325 a	70.5 a
8	333 a	72.2 a

ANEXO 9.- *Valores promedio del efecto de la interacción: tratamiento por momento de muestreo para las variables respiración microbiana y Cociente de mineralización del C orgánico (qM) en el tercer período de estudio. Estación Experimental: “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).*

Fechas	Control	Tratado	Control	Tratado
	Respiración		qM	
64	293 a	314 a	63.6 a	64.6 a
70	244 a	237 ab	52.9 a	51.3 ab
73	354 a	187 b	76.9 a	40.5 b
80	231 a	242 ab	50.1 a	52.6 ab

ANEXO 10. *Valores promedio del efecto de los momentos de muestreo para las variables: respiración microbiana y Cociente de mineralización del C orgánico (qM) en el tercer período de estudio. Estación Experimental: “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).*

Fechas	Resp	qM
64	303 a	65.8 a
70	240 a	52.1 a
73	270 a	58.7 a
80	237 a	51.4 a

ANEXO 11. *Valores promedio del efecto de los tratamientos para las variables: respiración microbiana (Resp.) y Cociente de mineralización del C orgánico (qM) en el tercer período de estudio. Estación Experimental: “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).*

Trat	Resp	qM
Control	280 a	65.9 a
Tratado	245 a	53.1 a

ANEXO 12. - Valores promedio de las actividades enzimáticas ($\mu\text{g p-nitrofenol.g}^{-1}$ suelo. h^{-1}) para el efecto promedio de los tratamientos en el periodo de estudio, probabilidad de la diferencia observada ($P>F$). Tratamientos señalados con la misma letra no difieren por Tukey al 5%. Estación Experimental “Dr. Mario. A Cassinoni” (EEMAC). Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

Variables enzimáticas	Promedio control	Promedio tratado	(P> F)
Fosfatasa ácida ($\mu\text{g p-nitrofenol.g}^{-1}$ suelo. h^{-1})	141.88 A	121.38 A	0.8677
Fosfatasa alcalina ($\mu\text{g p-nitrofenol.g}^{-1}$ suelo. h^{-1})	59.796 A	38.523 A	0.0758
FDA ($\mu\text{g p-nitrofenol.g}^{-1}$ suelo. h^{-1})	48.258 A	43.418 A	0.6861
Activ.relafosfatasa ácida	10,970 A	11,698 A	0,6130
Activ. Relat.va fosfatasa alcalina	4,642 A	4,000 A	0,6533
Actividad relativa FDA	4,520 A	3,712 A	0,6403

ANEXO 13.-

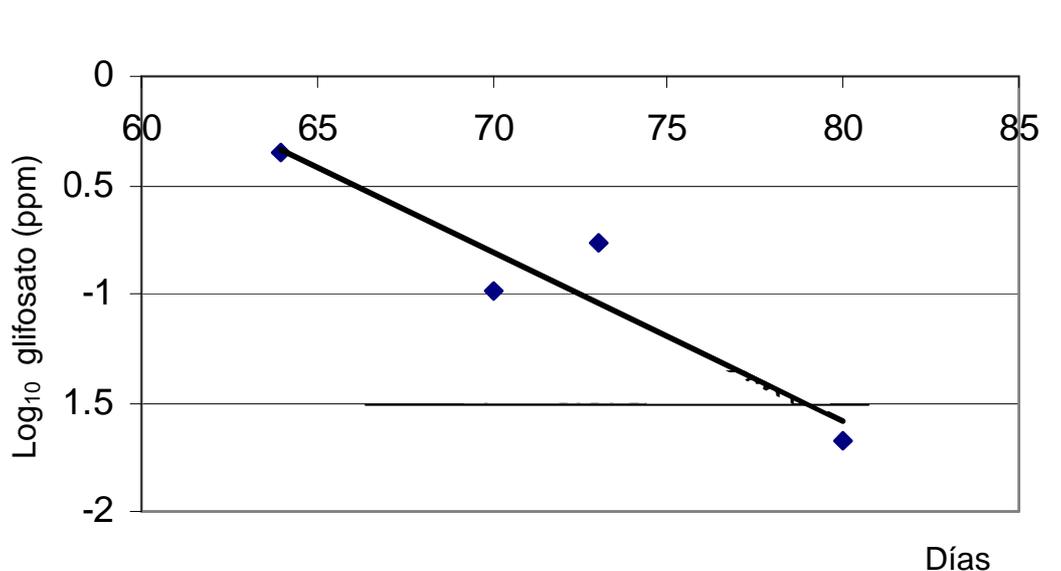
Valores promedio de glifosato (ppm) y AMPA (ppm), al inicio del experimento (día 0) y en los muestreos luego de la tercera aplicación (día 64 del inicio del experimento) y hasta el día 190 (cosecha de soja) determinados en las parcelas tratadas. Estación Experimental: “Dr. Mario. A.Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

ppm\día	0	64	70	73	80	94	190
GLIFOSATO	0.212 ab	0.447 a	0.102 b	0.171 b	0.021 b	0.093 b	0.035 b
AMPA	0.142 a	0.210 a	0.899 a	0.396 a	0.630 a	0.338 a	0.100 a

ANEXO 14.- Resultados de ANOVA para Glifosato y AMPA con un nivel de significación del 5% (p-valor). Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC). Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

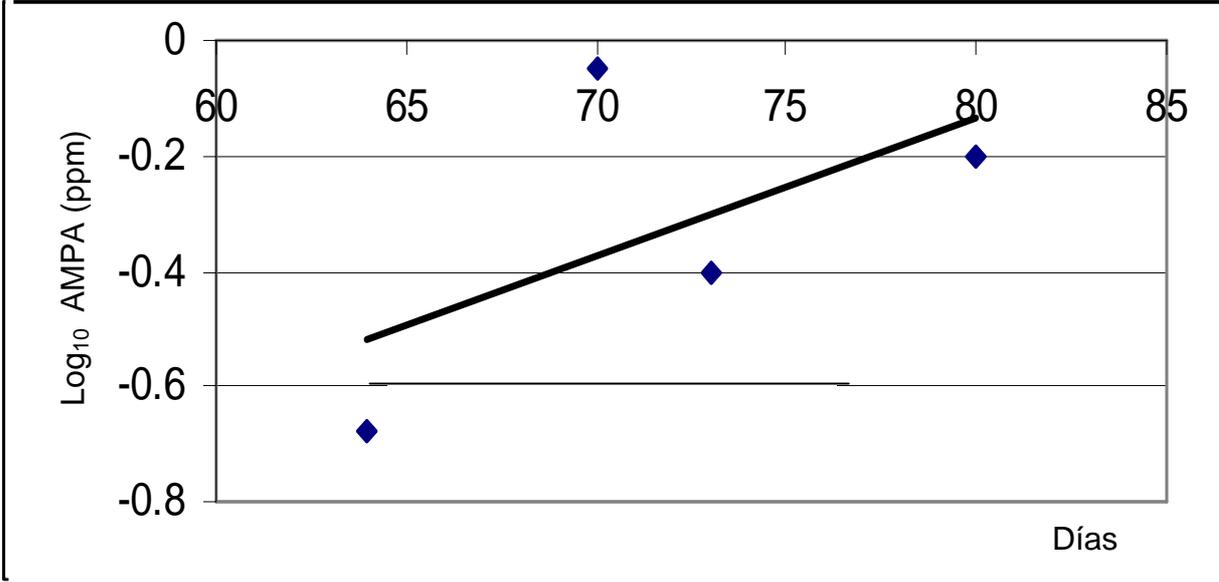
Variables	p-valor = (P>F)	
	Glifosato(ppm)	AMPA(ppm)
Variables	0,52	0,98
Momento de Muestreo (M.M)	0,003	0,79

ANEXO 15.- Determinación de la vida media del glifosato. Estación Experimental: “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).



Recta ajustada entre el logaritmo (base 10) de la concentración (ppm) de glifosato y los días ($y = -0.078x + 4.6516$; $R^2 = 0.8728$) , a partir de la tercera aplicación (día 64 del inicio del experimento) y hasta 16 días después. Estación Experimental “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

ANEXO 16.- *Determinación de la vida media del AMPA. Estación Experimental: “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).*



Recta ajustada entre el logaritmo (base 10) de la concentración (ppm) de AMPA y los días ($y= 0.0239x -2.0502$; $R^2= 0.3405$), a partir de la tercera aplicación (día 64 del inicio del experimento) y hasta 16 días después. Estación Experimental “Dr. Mario. A.Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).

ANEXO 17.- *Promedio general y Coeficiente de Variación (CV%) de las variables microbiológicas, glifosato y AMPA.*

Variables	Promedio general	CV (%)
Biomasa microbiana (mg C-Kg ⁻¹ suelo seco)	1070	50
Respiracion microbiana (mg C-Kg ⁻¹ suelo seco)	273	32
qM (mg C-CO ₂ respiración. C-total ⁻¹).100	59,2	32
qMic (C-biomasa microbiana como porcentaje del C orgánico total)	5,61	50
qCO₂ (mg C-CO ₂ .h ⁻¹ .mg C-biomasa. h ⁻¹)	0,0014	99
Fosfatasa ácida (µg p-nitrofenol.g ⁻¹ suelo.h ⁻¹)	133	35,60
Fosfatasa alcalina (µg p-nitrofenol.g ⁻¹ suelo.h ⁻¹)	50,3	24,99
FDA (µg p-nitrofenol.g ⁻¹ suelo.h ⁻¹)	46,1	21,40
Activ.relafosfatasa ácida (activ.enzim. x C.biomasa)	11,3	41,29
Activ. relat. fosfatasa alcalina (activ.enzim. x C.biomasa)	4,4	55,38
Actividad relat. FDA (activ.enzim. x C.biomasa)	4,07	50,03
Glifosato (ppm)	0,14	114
AMPA (ppm)	0,34	144

ANEXO 18. *Análisis Multivariado de Componentes Principales. Estación Experimental: “Dr. Mario. A. Cassinoni” (EEMAC), Paysandú, Uruguay (Período 2006-2007).*

Datos estandarizados

Autovalores

<u>Lambda</u>	<u>Valor</u>	<u>Proporción</u>	<u>Prop Acum</u>
1	2.90	0.41	0.41
2	2.33	0.33	0.75
3	0.94	0.13	0.88
4	0.73	0.10	0.99
5	0.10	0.01	1.00
6	0.00	0.00	1.00
<u>7</u>	<u>0.00</u>	<u>0.00</u>	<u>1.00</u>

Autovectores

<u>Variables</u>	<u>e1</u>	<u>e2</u>
RESP	0.48	0.34
BIOM	-0.31	0.54
QCO ₂	0.56	-0.10
QM	0.48	0.34
QMIC	-0.31	0.54
GLI	0.11	0.38
<u>AMPA</u>	<u>-0.13</u>	<u>-0.17</u>

Correlaciones con las variables originales

Variables CP 1 CP 2

RESP 0.82 0.53

BIOM -0.53 0.82

QCO₂ 0.95 -0.16

QM 0.82 0.53

QMIC -0.53 0.82

GLI 0.19 0.57

AMPA -0.22 -0.25

Correlación cofenética= 0.906