

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Trabajo Final presentado para optar al
Grado de Ingeniero Agrónomo

Proyecto de investigación



“Análisis de bioacumulación de glifosato y estudio sobre la capacidad detoxificante de bacterias PGPR en Maíz”

Alumno: Martín Andrés Lucero (DNI: 30771211)

Director: Dra. Virginia Luna

Co- director: MSc. Oscar Masciarelli

Río Cuarto-Córdoba

Junio 2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: **Análisis de bioacumulación de glifosato y estudio sobre la capacidad detoxificante de bacterias PGPR en Maíz**

Autor: Martín Andrés Lucero

DNI: 30771211

Director: Dra. Virginia Luna

Co-Director: MSc. Oscar Masciarelli

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

Dra. Virginia Luna

Ing. Agr. MSc. Fernando Daita

Dr. Javier A. Andrés

Fecha de Presentación: 30 de junio de 2015

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

A mi familia

Al Ingeniero Agrónomo Edgardo Zorza

A todo el grupo de trabajo

A todos mis compañeros y amigos de la carrera

INDICE

RESUMEN-----	pag.1
SUMMARY-----	pag.2
INTRODUCCIÓN-----	pag.3
Herbicida-----	pag.3
Detoxificación por metabolización-----	pag.6
Interacción herbicida/inoculantes biológicos-----	pag.7
El uso de bacterias PGPRs-----	pag.8
Prácticas agrícolas-----	pag.9
Panorama propuesto-----	pag.11
HIPOTESIS-----	pag.12
OBJETIVOS-----	pag.13
MATERIALES Y METODOS-----	pag.14
Ubicación geográfica-----	pag.14
Clima-----	pag.14
Ensayos a campo-----	pag.15
Análisis espectral/cuantificación de glifosato-----	pag.18
Análisis estadístico-----	pag.18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	pag.19
Acumulación de residuos según dosis de aplicación-----	pag.19
Acumulación de residuos según momento de aplicación-----	pag.20
Capacidad detoxificante de las bacterias PGPRs-----	pag.21
Acumulación de glifosato y su sal amónica, límites mínimos admisibles según códigos pertinentes-----	pag.23
Discusión-----	pag.24
CONCLUSIONES-----	pag.26
BIBLIOGRAFÍA-----	pag.28
ANEXOS-----	pag.34

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-----	Pag.5
Tabla 2-----	Pag.19
Tabla 3-----	Pag.20
Tabla 4-----	Pag.21
Tabla 5-----	Pag.21
Tabla 6-----	Pag.22

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-----	Pag.14
Figura 2-----	Pag.16
Figura 3-----	Pag.17
Figura 4-----	Pag.19
Figura 5-----	Pag.20
Figura 6-----	Pag.22
Figura 7-----	Pag.23

RESUMEN

El glifosato [N- (phosphonomethyl) glycina] es un herbicida no selectivo, de post-emergencia y amplio espectro, el cual inhibe la síntesis de algunos aminoácidos aromáticos. Es utilizado especialmente en cultivos transgénicos resistentes al mismo. Hay escasa información sobre su bioacumulación en cultivos. Por otra parte, se ha probado que las bacterias PGPR son capaces de tolerar la presencia de herbicidas así como de degradar distintos compuestos tóxicos. Este trabajo tiene por objetivo el analizar si existe acumulación de glifosato en el grano de maíz (*Zea maíz*) tras recibir aplicaciones del herbicida y si se acumula ante la aplicación en distintos momentos y dosis. A su vez, se trata de comprobar si las bacterias PGPR, *Azospirillum* y *Pseudomonas*, tienen capacidad de disminuir estos residuos . Los tratamientos fueron: una aplicación en V3, una aplicación en V6, dos aplicaciones (en los estadios antes mencionados) y para cada momento se usaron dosis de 2,5 y 5 lts/ha. También se aplicaron ambas PGPR usando como testigo la dosis de 2,5 lts/ha. Al finalizar el ciclo se recolectaron tres espigas de cada tratamiento y de cada repetición, es decir nueve espigas por tratamiento. Se desgranaron, se mezclaron las repeticiones, y se molió el grano. La cuantificación de residuo se llevó a cabo por medio de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, se analizaron los patrones puros de glifosato (m/z: 170/113), la sal de glifosato Isopropilamonio (m/z: 229/184) y el derivado del metabolismo de glifosato (AMPA) (m/z: 110/63). Se encontró evidencia estadísticamente significativa de que existe acumulación de glifosato en grano tras recibir aplicaciones del herbicida, también que el aumento en la dosis de aplicación produce aumento en acumulación del residuo y que la aplicación foliar de bacterias PGPR disminuye dicha concentración. No se encontró relación estadística entre momento de aplicación y cantidad de residuo.

SUMMARY

Glyphosate [N- (phosphonomethyl) Glycine] is a non selective post-emergence broad spectrum herbicide of, which inhibits the synthesis of some aromatic amino acids. It is used especially in resistant transgenic crops. There is little information on its bioaccumulation in crops. Moreover, it has been proven that PGPR bacteria are able to tolerate the presence of herbicides and degrade other toxic compounds. This work aims to analyze whether there is accumulation of glyphosate in maize (*Zea mīze*) after receiving applications and, if different concentrations at different times and rates of application are presented. In turn, it is checked whether PGPR bacteria *Azospirillum* and *Pseudomonas* are capable of reducing this waste. Treatments were: an application in V4, an application in V6, two applications (in the above stages) and time for each dose of 2.5 to 5 liters / ha are used. Also was applied to both PGPR using a dose of 2.5 l / ha as a witness. After the cycle, three spike of each treatment were collected from each repetition. That is nine spikes per treatment. They were shelled, repetitions were mixed, and the grain was milled. Quantification of residue was carried out through liquid chromatography coupled to mass spectrometry, the pure standards glyphosate (m / z: 170/113), glyphosate isopropylammonium salt (m / z: 229/184) and the metabolic derivative glyphosate (AMPA) (m / z: 110/63) were analyzed. Statistically, significant evidence that there is accumulation of glyphosate in grain after receiving applications of herbicide was found. It was also found that the increase in the application doses produces increased accumulation of waste and foliar application of PGPR bacteria decreases the concentration. No statistical relationship between timing and amount of residue was found.

INTRODUCCIÓN

Para asegurar la inocuidad de los alimentos es necesario tomar en consideración todos los aspectos de la cadena de producción alimentaria y entenderla como un proceso continuo desde la producción primaria pasando por la producción de piensos para animales, hasta la venta o el suministro de alimentos al consumidor, pues cada elemento tiene el potencial de influir en la seguridad alimentaria (Reglamento European Commission, 178/2002).

La efectividad de los controles requiere el desarrollo de regulaciones cualitativas y cuantitativas que contemplen las relaciones entre residuos de agroquímicos y los factores que condicionan su nivel, como ser: a) propiedades físicas y químicas de los compuestos. b) condiciones de aplicación (velocidad, dosis, frecuencia, etc.) c) condiciones climáticas d) particularidades estructurales y químicas de los sitios u objetos de tratamiento, y e) procesos de producción y conservación (Spynu, 1989).

Herbicida

El glifosato [N-(phosphonomethyl)glycine] es un herbicida no selectivo, de post-emergencia y de amplio espectro, ampliamente utilizado para el control de malezas. Introducido por la empresa Monsanto en la década del 70 como el principio activo del formulado Round Up®, es quizá el herbicida más utilizado del planeta.

Es un herbicida sistémico no selectivo de amplio espectro que, cuando es translocado en toda la planta, inhibe la producción de algunos aminoácidos aromáticos esenciales para el crecimiento vegetal, tales como fenilalanina, tirosina y triptófano (Franz *et al.*, 1997). El principal metabolito natural en la planta y el suelo es el ácido aminometilfosfónico (AMPA). Por la naturaleza de sus propiedades físicas y químicas, el glifosato no es apto para tratamientos de control de malezas por la vía del sistema radicular.

Luego de la aplicación, el glifosato es absorbido por el follaje y traslocado hacia el tallo, hojas y raíces de toda la planta. Su efecto inhibitorio en plantas susceptibles está basado en la unión con la enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) responsable de la ruta biosintética de los ya nombrados aminoácidos aromáticos. (Smith *et al.*, 1992)

Los cultivos tolerantes a glifosato son obtenidos mediante la transferencia de genes que decodifican para una variante de la EPSPS con menor sensibilidad al glifosato y con muy poca o

ninguna eficiencia catalítica del herbicida. Estos genes proveen un alto nivel de resistencia. (Dyer, 1994)

En Argentina, cuyo modelo de agricultura actual está basado en la siembra directa. Su utilización en un paquete tecnológico que incluye cultivos genéticamente modificados resistentes a glifosato (Roundup® Ready) está muy difundida. Esta tolerancia por parte de los cultivos conlleva a la utilización masiva de este herbicida para el control de malezas ya que puede aplicarse durante todo el ciclo del cultivo sin causar daños al mismo. Según datos de CASAFE (2009) en el mercado nacional de 2007 se vendieron más de 160 millones de litros.

Los dos cultivos predominantes con estas características son la soja (*Glicine max*) y el maíz (*Zea maíz*).

Existe poca información sobre la bioacumulación del glifosato en estas especies existiendo antecedentes como el trabajo de Arregui *et al.* (2003) en el cual se monitorearon tres campos de la provincia de Santa Fe con dos y tres aplicaciones de glifosato isopropilamina en distintas concentraciones, obteniéndose residuos de glifosato que van de 1.9 a 4.4 mg kg⁻¹ en hojas y tallos y de 0.1 a 1.8 en granos de soja (*Glicine max*). Por otra parte, Lorenzatti *et al.* (2004) encontraron pequeñas concentraciones en grano de soja verde y en algunos alimentos procesados a partir del grano del mismo cultivo.

El LMR es la máxima concentración de residuos de un plaguicida que legalmente puede contener un producto, destinado al consumo humano o cuando es utilizado para pienso animal, expresado en mg de plaguicida / kg de producto alimenticio. (Codex Alimentarius, 1997).

Para el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) el LMR se refiere a la concentración máxima de un residuo de productos fitosanitarios, que se permite o reconoce legalmente como aceptable en o sobre un alimento, producto agrícola o alimento para animales.

Mediante la Resolución N° 507/2008 la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA) ha fijado los LMR actualmente en vigencia. De acuerdo a la mencionada resolución el listado de los LMR de glifosato en granos se indican en la siguiente tabla:

Tabla 1: Límites máximos de residuos de glifosato (en mg/kg peso) en granos

Producto	LMR (mg/Kg)
Girasol (grano de consumo)	0,2
Maíz dulce (grano consumo)	0,1
Maíz (grano consumo)	1
Maní (grano consumo)	0,1
Soja (forraje verde)	20
Soja (grano consumo)	5
Soja (grano no maduro)	0,2
Sorgo (forraje verde)	20
Trigo (grano consumo)	5

Fuente: Resolución SAGPyA N° 507/2008

Cabe destacar que previo a su comercialización, el grano de soja por lo general sufre algún tipo de transformación o proceso, ya sea físico como desactivado por medio de altas temperaturas para hacerla apta para consumo de ganado monogástrico, estrusado con presión y altas temperaturas para la extracción de su aceite o extracción de aceite por medio de solventes como el hexano. Estos procesos disminuyen la concentración de los residuos con respecto al grano sin procesar.

En el caso del maíz, el mismo es utilizado normalmente en forma directa para consumo animal por medio de una molienda por lo cual conservaría las concentraciones originales del grano post cosecha.

El consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICET) en el informe realizado bajo el decreto 21/2009 sobre la evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente concluye en forma parcial que “*a pesar de los escasos datos existentes sobre los niveles de residuos de glifosato y AMPA en los productos alimenticios, el consumo de alimentos conteniendo residuos de glifosato y su*

metabolito , cuando se aplican buenas practicas agrícolas, aportaría una minima porción de la Ingesta Diaria Admisible (IDA) lo cual no constituiría un riesgo para la salud de los consumidores”. Con respecto a esta última afirmación, no especifica cuales son las buenas practicas agrícolas (BPA) en lo referente a las aplicaciones de glifosato.

Para la degradación de glifosato, la transformación microbiana es tal vez la principal vía, pasando por intermediarios fugaces como AMPA (ácido amino metil fosfónico, altamente tóxico), sarcosina y formaldehído, a bióxido de carbono, en el cual se detecta la mayor cantidad de radioactividad recuperada en diferentes estudios, Realizados con ¹⁴C-glifosato (Weed Science Society of America, 1994).

Varias cepas bacterianas poseen la capacidad de descomponer y degradar el glifosato. En la mayoría de los experimentos de laboratorio, la tasa de degradación de glifosato en suelos, parece ser rápida. En general, el proceso puede ser descrito como una cinética lineal de primer orden (Weed Science Society of America, Herbicide Handbook, *Gliphosate*, p150, 7th. Edition, 1994). Asimismo, Monsanto tiene estudios que dice que el glifosato, como herbicida, se inactiva y degrada rápidamente en el suelo. La Agencia Ambiental de Estados Unidos ha reportado que la vida media del glifosato en el suelo puede ser hasta 60 días o más, según EPA (1999). La EPA (Washington US, Environmetnal Protection Agency) añade que en estudios de campo los residuos se encuentran a menudo al año siguiente.

Algunas de las formulaciones comerciales del glifosato incorporan un surfactante conocido como POEA, en una proporción cercana al 15 %. Este compuesto, según varias investigaciones toxicológicas, puede ser causa de daños gastrointestinales, ciertas afecciones al sistema nervioso central, algunos problemas respiratorios y ser capaz de destruir los glóbulos rojos en la sangre humana. Del POEA se dice, también, que puede contener una impureza identificada como 1-4 dioxano la cual, ha demostrado tener capacidad cancerígena para animales y de causar daño en el hígado y los riñones de los humanos. (Bolognesi *et al.*, 1997).

Detoxificación por metabolización

Según Villalba A., (2009), los biotipos o poblaciones resistentes a un herbicida en particular, degradan el herbicida a metabolitos no fitotóxicos. Los biotipos resistentes son capaces de degradar el herbicida antes que éste cause daños irreversibles. La velocidad de degradación enzimática puede variar por factores endógenos y exógenos, tales como el estadio de crecimiento de la planta y las condiciones meteorológicas.

Los procesos de detoxificación metabólica de herbicidas en tejidos vegetales pueden dividirse en tres fases: conversión, conjugación y deposición. Esta división no es una regla general dado que alguna de las fases puede faltar. La molécula del herbicida puede estar proherbicida inactivo que debe ser enzimáticamente convertido en compuesto activo o bien en ciertos casos puede haber procesos de conjugación que son de carácter reversible, por lo que afectan parcialmente la cantidad de herbicida libre intracelular.

Fase 1. Conversión: en el caso de los herbicidas que no tienen sustituyentes disponibles (grupos amonio, hidroxilo, etc.) para formar conjugados, deben ser convertidos en metabolitos mediante una reacción química.

Fase 2. Conjugación: los conjugados suelen ser los metabolitos finales en los procesos de detoxificación de herbicidas y su naturaleza puede ser diversa (azúcares, aminoácidos, péptidos y lignina como grupos orgánicos, y enlaces éster, éter, amida o glicosídico).

Fase 3. Deposición: los conjugados glicosídicos son depositados en la vacuola donde quedan almacenados, mientras que los de origen aminoacídico son excretados a la pared celular donde se integran en el componente de lignina de éstas, formando un residuo insoluble. Estos procesos no son irreversibles, pero su conversión a herbicida activo intracelular es muy lenta.

Interacciones Herbicida/Inoculantes Biológicos

Existen estudios sobre la interacción glifosato/inoculantes realizados con soja transgénica con resistencia a glifosato. Zablotowicz y Reddy (2004) encontraron que la bacteria *Bradyrhizobium japonicum*, que fijan nitrógeno en las raíces de la soja, posee una enzima sensible al glifosato que cuando está expuesta a este herbicida, acumula ácido shikímico y ácidos hidroxibenzoicos, lo que produce la inhibición del crecimiento y hasta la muerte de la bacteria en altas concentraciones. Se encontró además que el glifosato se acumula en los nódulos de las raíces de la soja. Por lo tanto, es posible que estos procesos se den en otras leguminosas repercutiendo en el crecimiento de las plantas y en la salud del suelo en general.

Este herbicida afecta el agro-ecosistemas especialmente el ciclo del nitrógeno, fenómeno informado por Hutchinson, (1995) y Nielsen y Favilli (1995). Un estudio hecho en la India con suelos degradados provenientes de plantaciones de te tratados con glifosato, demostró una reducción en las colonias de bacterias fijadoras de Nitrógeno (Bezbaruah *et al*, 1994). Se ha

reportado también una inhibición en la nodulación en raíces de trébol en suelos con niveles de glifosato de entre 2 y 2000 mg/Kg de suelo, cuyo efecto persistió 120 días después de la aplicación (Eberbach *et al.*, 1983).

Por otra parte, las PGPRs (rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas) han demostrado poseer capacidad para tolerar presencia de herbicidas (Omar *et al.*, 1992), de degradar xenobióticos, tales como compuestos fenólicos y benzoatos (Venkateswarlu and Sethunatan, 1984). Además, se ha demostrado su habilidad para metabolizar exudados radiculares, bioproductos intermediarios de la biodegradación de moléculas aromáticas, tales como ligninas, taninos y xenobióticos halogenados (Blum *et al.*, 1991). No obstante es muy poco lo que se ha estudiado sobre el efecto de herbicidas sobre el crecimiento bacteriano, especialmente de los géneros más utilizados en la fabricación de inoculantes como de *Azospirillum* y de algunas cepas del género *Pseudomonas in Vitro*, solo existen datos sobre la disminución de la actividad nitrogenasa en raíces asociadas a *Azospirillum* con la presencia de glifosato, 2,4-D, y otros como Mepro y Dipro (Haahtela *et al.*, 1988).

El uso de bacterias PGPRs

Los microorganismos, y en especial *Azospirillum* y *Pseudomonas*, tienen un papel fundamental o protagónico en diversas actividades que afectan el desarrollo, nutrición y salud de las plantas, y asimismo producen un beneficio en el suelo.

Bacterias no simbióticas que fijan nitrógeno atmosférico, y que viven en la rizósfera (Dobereiner, 1997; Schilling *et al.*, 1998) o endofíticamente (Hecht-Buchholz, 1998), a menudo provocan aumento de los rendimientos de los cultivos. Muchas de estas especies de bacterias fijadoras de N₂ poseen estas propiedades, incluyendo *Bacillus* spp., *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp., *Beijerinckia*, *Pseudomonas* spp., etc (Reis *et al.*, 1994; Dobereiner, 1997; Vance, 1997).

Una de las explicaciones del efecto del uso de PGPRs sobre la estimulación del crecimiento vegetal es la producción de reguladores del crecimiento (Zahir *et al.*, 2004), habiéndose identificado varios de ellos en sobrenadantes de cultivos de *A. brasilense* y *Pseudomonas sp* (auxinas, zeatina, giberelinas, ácido abscísico y etileno). En términos cuantitativos, la fitohormona más importante producida por estas bacterias es la auxina ácido indol-3-acético (AIA) (Masciarelli O., 2013) se ha propuesto que la producción de esta hormona por la bacteria es la causante de los cambios del sistema radical tras la inoculación, los cuales se relacionan con

una mayor absorción de nutrientes. El AIA bacteriano interactúa con la planta y posee el potencial para influir sobre algunos de estos procesos mediante cambios en un camino espaciotemporal del pool de auxinas de la planta. El impacto de auxinas exógenas sobre el desarrollo de las plantas oscila entre efectos positivos y negativos, siendo usualmente función de la cantidad de AIA disponible, y la sensibilidad del tejido vegetal a los cambios en la concentración de AIA.

Masciarelli (2010) demostró que al menos en parte, la capacidad de promoción del crecimiento del sistema radical de maíz por *Azospirillum* sp. depende de la síntesis de AIA, y que esta hormona es parte de un todo constituido por el fermento completo = medio de cultivo +bacterias+ la adición de Trp (dl-Triptófano). La sola participación de la bacteria no es suficiente para la promoción del crecimiento temprano de la plántula (medido como peso seco aéreo), sino que también es necesario el AIA producido por ésta y liberado al medio (sobrenadante). También se evidenció que el AIA en los sobrenadantes es el promotor de los cambios producidos en la exomorfología y la anatomía del ápice radicular. El AIA bacteriano sería utilizado esencialmente para el desarrollo de raíces y probablemente para generar un microcosmos alrededor de las raíces favoreciendo una mayor afinidad con las bacterias. En éste sentido, Perrig et al (2007) pudieron corroborar que dos cepas de *A. brasilense* producen compuestos promotores del crecimiento de plantas, pudiéndose cuantificar en los cultivos *in vitro* etileno, ácido indol-3-acético, ácido giberélico, zeatina, ácido abscísico y poliaminas. Además observaron que algunos de ellos incrementaron su contenido cuando se le adicionó el precursor de biosíntesis.

Prácticas agrícolas

Las prácticas agrícolas extensivas, que pretenden alto rendimiento, requieren el uso generalizado de fertilizantes químicos, que son costosos y crean problemas ambientales. Por lo tanto, más recientemente ha habido un resurgimiento del interés en el medio ambiente sostenible, por ejemplo, las prácticas de agricultura orgánica (Esitken et al., 2005).

La utilización de bio-fertilizantes que contienen microorganismos benéficos, en lugar de productos sintéticos químicos, otorgan la ventaja de mejorar el crecimiento vegetal mediante el suministro directo de nutrientes o facilitando la incorporación de los mismos, aportando reguladores del crecimiento, a la vez que, por tratarse de productos biológicos, son amigables con el ambiente.

Si bien esta práctica de utilización de biofertilizantes está ampliamente difundida en nuestro país, la misma ha consistido siempre en aplicar el producto en forma de inoculante en semilla. Son escasos los estudios sobre los efectos que estos productos podrían tener sobre el crecimiento vegetal mediante aplicación foliar.

Por ejemplo, estudios de la aplicación foliar de *Bacillus* OSU-142 y *Pseudomonas* BA-8 sobre maíz evidenciaron un aumento en el porcentaje de micronutrientes sobre las no tratadas (Esitken et al., 2006).

La utilización de reguladores del crecimiento a nivel foliar es una herramienta que se ha estudiado por diversos autores, y se ha comprobado que la respuesta varía según el tejido, la sensibilidad del mismo, la concentración de PGRs (Reguladores del Crecimiento de Planta). Se conoce que las citoquininas provocan un aumento en la apertura estomática, mientras que el ácido abscísico todo lo contrario; las giberelinas causan elongación del vástago y movimientos de fotoasimilados; y las auxinas un engrosamiento de las paredes del tallo y mejora redicular, salicílico mejora el área foliar (Davies, 2004; Travaglia et al, 2009).

Existe un vacío de información con respecto a la acumulación de glifosato en los granos de maíz, los cuales son utilizados tanto para consumo humano directo como para consumo de ganado, sumado a la falta de información con respecto a la influencia de las distintas dosis y momentos de aplicación sobre la concentración de residuo en los mismos, así como también la potencialidad del uso de bacterias PGPRs (*Azospirillum* y *Pseudomonas*) como facilitadores nutricionales, promotoras del crecimiento y *simultáneamente*, detoxificantes de residuos químicos.

Por todo lo expuesto, en este trabajo se pretende aportar conocimiento en este sentido, teniendo en cuenta la estructura química del glifosato y sus derivados, y los tipos de fuentes carbonadas que pueden utilizar las bacterias PGPR de los géneros *Azospirillum* y *Pseudomonas* para su metabolismo, sumado al hecho de que si bien son productoras de fitohormonas no hay información científica disponible respecto a los efectos en el crecimiento y rendimiento de los cultivos cuando la aplicación de bacterias PGPR se realiza por vía foliar.

Panorama propuesto

La utilización de estas bacterias PGPR, a nivel foliar para detoxificar granos de maíz contaminados por el uso de glifosato y compuestos químicos residuales, mejorando así la calidad de los granos. Este efecto sería aditivo al ya conocido aumento en los rendimientos de los cultivos, sustentabilidad al sistema y propósitos de introducir una práctica agrícola más saludable. También, podríamos conseguir cultivos con mejoras en sus respuestas a tolerancia a distintos patógenos aéreos, apuntando a la sanidad de los mismos. Con ello, se podría sustituir, al menos en parte, insumos de importación utilizados en las prácticas habituales de la fertilización foliar con químicos sintéticos y el uso de reguladores del crecimiento por su alto costo. Además, estamos apuntando a una práctica. Por otra parte, proponemos hacer una evaluación de la co-inoculación como una herramienta alternativa a la inoculación tradicional en cultivos de soja con la finalidad de aportar a la mejora de la respuesta del cultivo a la nutrición, a tolerar zonas marginales y/o condiciones de estrés abióticos, y a ayudar a la detoxificación de xenobiótico por parte de las PGPRs.

HIPOTESIS

H1: Se encontrará presencia de residuos de glifosato en granos de maíz RR tratados con el producto.

H2: Existe diferencia entre las cantidades de glifosato acumuladas en grano y las distintas dosis y momentos de aplicación.

H3: Las concentraciones de glifosato encontradas en algunos tratamientos superarán los límites máximos de residuos dispuestos por el SAGPyA-SENASA.

H4: La aplicación de las PGPRs a nivel foliar permitirán disminuir los residuos de glifosato en grano.

OBJETIVOS

- Confirmar la presencia de glifosato en semillas de maíz RR luego de un ciclo del cultivo llevado a cabo mediante prácticas agrícolas comúnmente utilizadas en la zona.
- Determinar la correlación existente entre las cantidades de glifosato acumuladas y las distintas dosis y momentos de aplicación del herbicida.
- Verificar si las concentraciones encontradas, superan los límites máximos tolerados por SAGPyA-SENASA.
- Demostrar que el uso y aplicación de las PGPRs a nivel foliar disminuyen las cantidades residuales del herbicida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación geográfica

El sitio de estudio está ubicado en el campo experimental de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC, cuyas coordenadas son: 33° 06' 29.71''S; 64°17'55.78''W. Está ubicado a 432 m.s.n.m. y su régimen de precipitación del área es de tipo monzónica.

Clima

La región de Río Cuarto presenta un clima templado sub húmedo, con precipitaciones que suelen exceder la evapotranspiración en los meses de primavera y otoño y con déficit puntuales en verano e invierno. La precipitación media anual normal es de 801,2 mm con valores extremos mínimos de 451,1 mm en 1988 y máximos de 1195,2 mm en 1984, para la serie 1978 – 2007 (Seiler *et al.*, 1995).

El régimen térmico es mesotermal, la temperatura media del mes más cálido (enero) es de 23°C con una máxima absoluta de 39,5°C. La temperatura media del mes más frío (julio) es de 9,1°C con una mínima absoluta de - 11,5°C. La amplitud térmica media anual es de 13,9°C. La fecha media de la primera helada es el 25 de mayo y la de última es el 12 de septiembre, siendo el período libre de heladas 255 días en promedio (Seiler *et al.*, 1995).

En cuanto a la fisiografía, la zona se caracteriza por presentar planicies intermedias suavemente onduladas, con presencia de médanos aislados asociados a lomas muy suavizadas. El relieve es normal – subnormal suavemente ondulado, con pendientes medias y largas de gradientes de hasta 1,5% (Cisneros *et al.*, 2000).

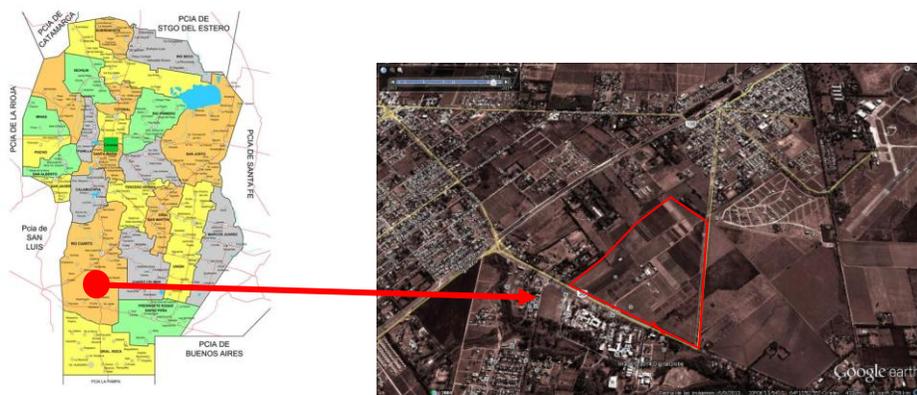


Figura 1: Ubicación geográfica del campo experimental de docencia de la UNRC

Ensayos de campo

Se realizaron ensayos con un mismo híbrido de maíz RR en parcelas sometidas a distintos tratamientos de aplicación por pulverización terrestre de Glifosato, en su formulación como concentrado soluble de sal amónica de la N-fosfometil glicina a una concentración de 39.2 g cada 100 ml, equivalentes a 35.6 P/V en ácido N-fosfometil-glicina marca “agm” con nombre comercial “Glifoweed”. Se trata de un producto de clasificación toxicológica banda verde o clase IV (normalmente no ofrece peligro).

Tratamientos:

- Una sola aplicación a 3-4 hojas.
- Una sola aplicación a 6-7 hojas.
- Dos aplicaciones: a 3-4 hojas y a 6-7 hojas.
- Un testigo o blanco sin ningún tratamiento

A su vez, para cada uno de los tratamientos anteriores se aplicarán dosis de 2.5 lts y 5 lts por Ha.

Para evaluar la acción del uso de las PGPRs a nivel foliar se usó una dosis de 2.5 lts/Ha en dos momentos del ciclo de cultivo. Los productos biológicos a base de las PGPRs utilizados correspondieron a productos comerciales de alta calidad.

Cada uno de los tratamientos era del ancho de nueve hileras sembradas a 52.5 cm, es decir 4,72 mts cada tratamiento.

Todas las parcelas fueron sembradas por medio de siembra directa con las aplicaciones de fertilizantes y demás fitosanitarios comúnmente usados en el cultivo, con el fin de reflejar lo más cercanamente posible la realidad de las prácticas en la zona.

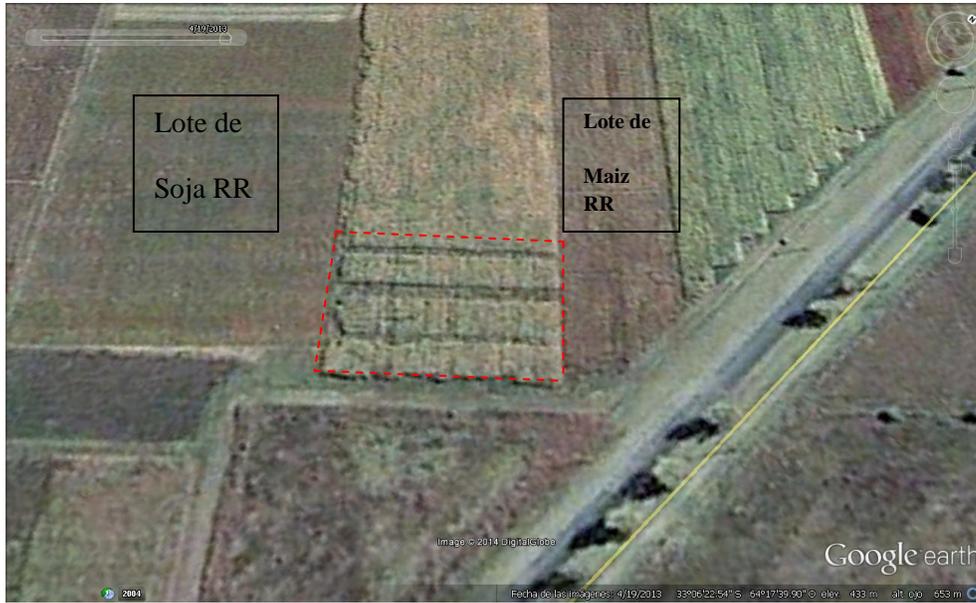


Figura 2: Imagen satelital del ensayo, en línea punteada roja se encuadra el ensayo con sus respectivas repeticiones.

Las parcelas se confeccionarán de la siguiente manera:

60 Mts

3-4 Hojas			6-7 Hojas			3-4 y 6-7 Hojas			B L A N C O		
2.5Lts		5 Lts	2.5 Lts		5 Lts	2.5 Lts		5 Lts			
A	A	P	A	A	P	A	A	A		P	A
C	Z	S	C	C	Z	S	C	C	Z	S	C
U	O	E	U	U	O	E	U	U	O	E	U
M	S	U	M	M	S	U	M	M	S	U	M
U	P	D	U	U	P	D	U	U	P	D	U
L	I	O	L	L	I	O	L	L	I	O	L
A	R	M	A	A	R	M	A	A	R	M	A
C	I	O	C	C	I	O	C	C	I	O	C
I	L	N	I	I	L	N	I	I	L	N	I
Ó	L	A	Ó	Ó	L	A	Ó	Ó	L	A	Ó
N	U		N	N	U		N	N	U		N
	M				M				M		

10 mts

Se realizaron tres repeticiones iguales de estas parcelas separadas por calles de 5 mts entre cada una.

La disposición de los tratamientos en cada una de las parcelas fue sometida a sorteo para aumentar el grado de aleatoriedad de las mismas. Las hileras que fueron blancos se colocaron siempre en el mismo sitio sin ser sometidas a sorteo ya que se busco evitar la deriva proveniente por los vientos predominantes del N-NE.

Hacia el oeste de las parcelas se encontraba un lote con soja (*Glicine max*) RR y hacia el este un lote con maíz también con la tecnología Roundup Ready®

La fecha de siembra fue el 27 de Noviembre de 2012 a una densidad de 70 mil plantas por ha y a una distancia entre hileras de 52,5 cm.

Las aplicaciones se realizaron con pulverizadora movilizada por tractor previa calibración del caudal de todos los picos. Se tuvo la precaución de realizar las aplicaciones a las primeras horas de la mañana con ausencia de viento para evitar derivas que perjudiquen el ensayo y conforme a las buenas prácticas agrícolas establecidas por la facultad de agronomía de la UNRC.

Los momentos fenológicos se determinaron por medio de la escala de Ritchie y Hanway (1982), que utiliza caracteres morfológicos externos. En ella se pueden distinguir dos grande periodos: el vegetativo y el reproductivo. El primero se subdivide en estadios identificados con la letra V y un subíndice, que señala el numero de orden de la ultima hoja completamente expandida (ligula visible) al momento de la observación (Satorre et al. 2003) Sin contarse la hoja cotiledonar.

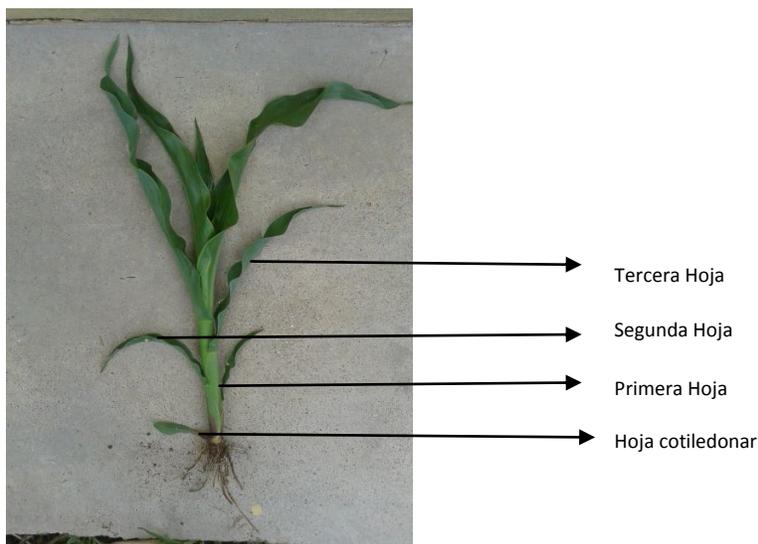


Figura 3: Estadio fenológicos de V3 según la escala Ritchie y Hanway.

La aplicación de los PGPR se realizó inmediatamente después de la aplicación del herbicida, por una cuestión de limitante práctica, con la misma maquinaria y previo lavado del tanque.

La cosecha se realizó el día 19 de Mayo de 2013, la misma fue manual y se extrajeron tres espigas al azar por cada una de las repeticiones y por cada tratamiento, es decir que en total se tomaron nueve espigas por tratamiento. Se desgranaron las espigas manualmente para posteriormente hacer una mezcla homogénea de los granos y finalmente realizar una molienda mecánica para obtener el material apto para el análisis de laboratorio.

Análisis espectral/cuantitativo glifosato

La cuantificación de glifosato se llevó a cabo por medio de cromatografía líquida (Waters Inc., MA, USA) acoplada a espectrometría de masas tandem (Micromass, MA, UK) (LC-MSMS). Se utilizó la técnica de homogeneización de los granos moliéndolos hasta polvo, luego se pesaron 3 gr de la molienda y se le agregaron 25 ml de H₂O deionizada y se colocaron los recipiente en ultrasonido durante 10 min, posteriormente se centrifugó 10 min a 5000 rpm, luego se repitió el proceso de sonicado y centrifugado para por último filtrar e inyectar 10 µl al equipo LC-MSMS. Se analizaron los patrones puros de glifosato (m/z: 170/113), la sal de glifosato Isopropilamonio (m/z: 229/184) y el derivado del metabolismo de glifosato (AMPA o aminometilfosfónico) (m/z: 110/63). Previamente, se construyeron curvas de calibración a partir de los distintos estándares para determinar y cuantificar las concentraciones halladas en el material. Estos analitos fueron evaluados por ionización por electro spray en modo + y a través de monitoreo de reacciones múltiples (MRM).

Análisis Estadístico

Por tratarse de muestras pequeñas, se recurrió al análisis estadístico no paramétrico de Friedman, utilizando el programa estadístico INFOSTAT versión estudiantil.

Cabe destacar que para el estudio de la capacidad detoxificante de las PGPR, los testigos fueron aquellos tratamientos que recibieron la aplicación de 2,5 lts de glifosato, mientras que el blanco para la comparación de la acumulación de residuos con respecto a las dosis de herbicida, fue aquel tratamiento que nunca recibió glifosato.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se exponen los resultados obtenidos, discriminados según las hipótesis planteadas.

Acumulación de residuo según dosis de aplicación

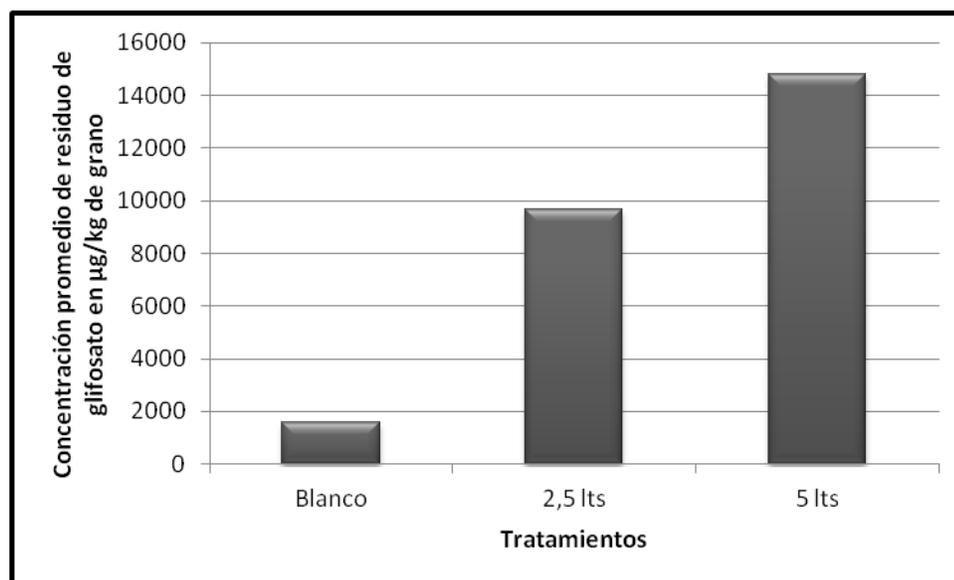


Figura 4: Concentración promedio de residuo de glifosato en grano de maíz en µg/kg según dosis de aplicación

Tabla 2: Analisis estadístico para la concentración de residuo de glifosato en grano de maíz según dosis de aplicación

Prueba de Friedman

2,5 lts	5 lts	control	T ²	p
2,00	3,00	1,00	1E30	<0,0001

Minima diferencia significativa entre suma de rangos = 0,000

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n	
control	3,00	1,00	3	A
2,5 lts	6,00	2,00	3	B
5 lts	9,00	3,00	3	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,050$)

Si tenemos en cuenta la figura 4 y la tabla 2, se puede observar que al aumentar la dosis de aplicación del herbicida en cuestión, la acumulación de residuo en el organo de cosecha, es también mayor. Esto es confirmado a través del análisis estadístico que encuentra diferencia estadísticamente significativa en cada uno de los tratamientos.

Se debe aclarar que también se encontraron residuos en los tratamientos usados como blanco, ya que si bien se tomaron los recaudos necesarios, el efecto de la deriva en las aplicaciones de la misma parcela o de las parcelas aledañas evidentemente produjo un contacto de estas plantas con el herbicida.

Acumulación de residuos según momento de aplicación

Tabla 3: Concentración de residuo de glifosato según momento de aplicación en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de grano

Tratamiento	Blanco	3/4 hojas	6/7 Hojas	3/4-6/7 Hojas
2,5 lts	-	7189	3075	18705
2.5 lts +Ps	-	1872	640	4175
2.5 lts+Az	-	2304	1831	2304
5 lts	-	3357	13666	27417
Media	1600	3680,5	4803	13150,25

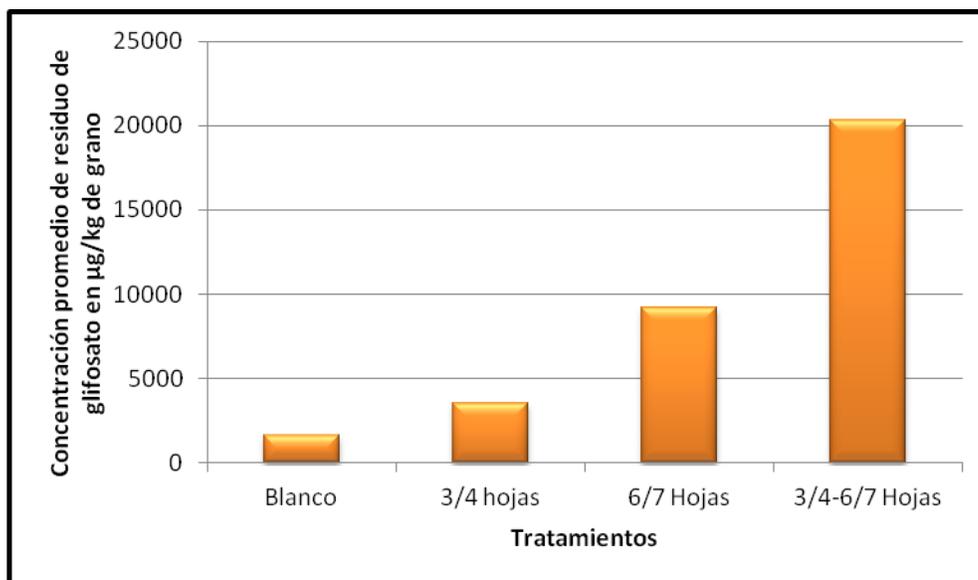


Figura 5: Concentración promedio de residuo de glifosato según momento de aplicación.

Tabla 4: Analisis estadístico para distintos momentos de aplicación de glifosato

Prueba de Friedman

Blanco	3/4 Hojas	6/7 Hojas	3/4-6/7 Hojas	T ²	p
1,25	2,88	2,00	3,88	11,18	0,0022

Minima diferencia significativa entre suma de rangos = 4,332

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n			
Blanco	5,00	1,25	4	A		
6/7 Hojas	8,00	2,00	4	A	B	
3/4 Hojas	11,50	2,88	4		B	C
3/4-6/7 Hojas	15,50	3,88	4			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,050)

Con respecto al momento de aplicación, al observar la tabla 3 y la figura 5, las cuales tienen en cuenta el promedio de los datos, se puede decir que a medida que avanzamos en los estadios fenológicos y nos acercamos a floración, la acumulación de residuo es mayor, si bien esto es refutado por el análisis estadístico (Tabla 4) el cual coloca al estadio de 6-7 hojas por debajo de aquel con 3-4 hojas. Queda claro que la mayor concentración, con diferencia estadísticamente significativa, la presenta el tratamiento que recibió dos aplicaciones en dos estadios fenológicos diferentes.

Capacidad detoxificante de las bacterias PGPR

Tabla 5: Disminución de la concentración de glifosato en µg por kg de grano de maíz por parte de las bacterias *Azospirillum* y *Pseudomonas*

Tratamiento	Testigo	Pseudomonas	Azospirillum
3/4 Hojas	7189	1872	2304
6/7 Hojas	3075	640	1831
3/4-6/7 Hojas	18705	4175	2304
Media	9656,333333	2229	2146,33333

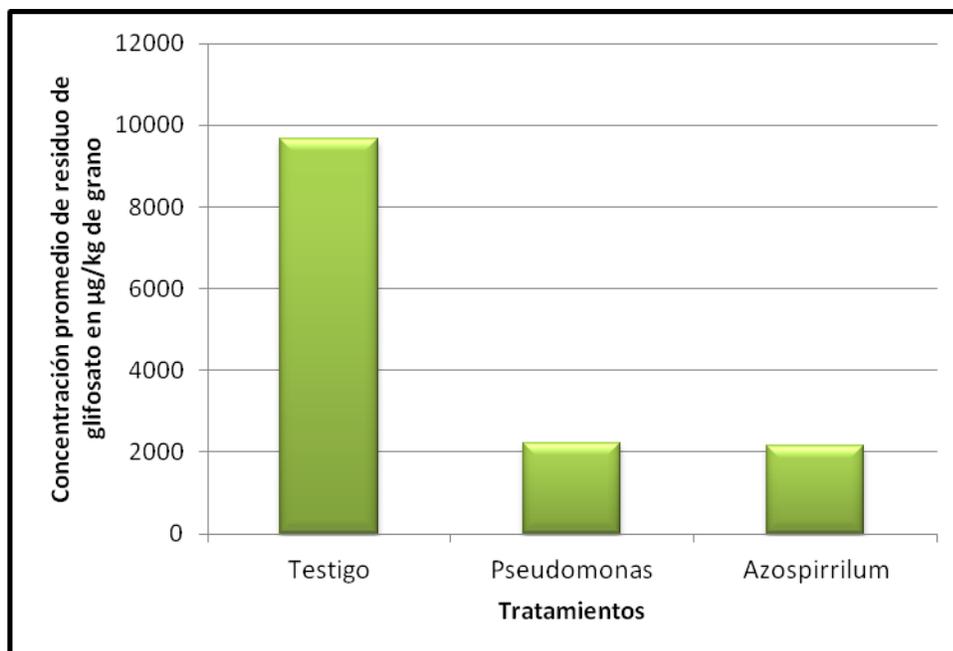


Figura 6: Concentración promedio de glifosato con y sin aplicación de bacterias PGPR

Como se observa tanto en la tabla 5 como en la figura 6, la aplicación foliar de las bacterias PGPR, disminuyó la concentración promedio de residuos de glifosato en el grano de maíz, si lo comparamos con el testigo, el cual recibió aplicación de glifosato sin posterior fertilización foliar. Se puede destacar también una mayor capacidad detoxificante del *Azospirillum* con respecto a *Pseudomonas*.

Tabla 6: Análisis estadístico para el comportamiento detoxificante de bacterias PGPR

Prueba de Friedman

Testigo	Azospirillum	Pseudomonas	T ²	p
3,00	1,67	1,33	7,00	0,0494

Minima diferencia significativa entre suma de rangos = 3,926

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n		
Pseudomonas	4,00	1,33	3	A	
Azospirillum	5,00	1,67	3	A	B
Testigo	9,00	3,00	3		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,050$)

En el análisis estadístico (tabla 6), se puede observar que la mayor capacidad detoxificante de Azospirillum con respecto a Pseudomonas que se muestra en la tabla 5, no es estadísticamente significativa, por lo que poseen una eficiencia similar en cuanto a la metabolización del glifosato dentro del vegetal. Se ratifica la diferencia estadísticamente significativa de los tratamientos con PGPR con respecto al testigo que solo recibió glifosato.

Acumulación de glifosato y su sal amónica, límites mínimos admisibles según códigos pertinentes

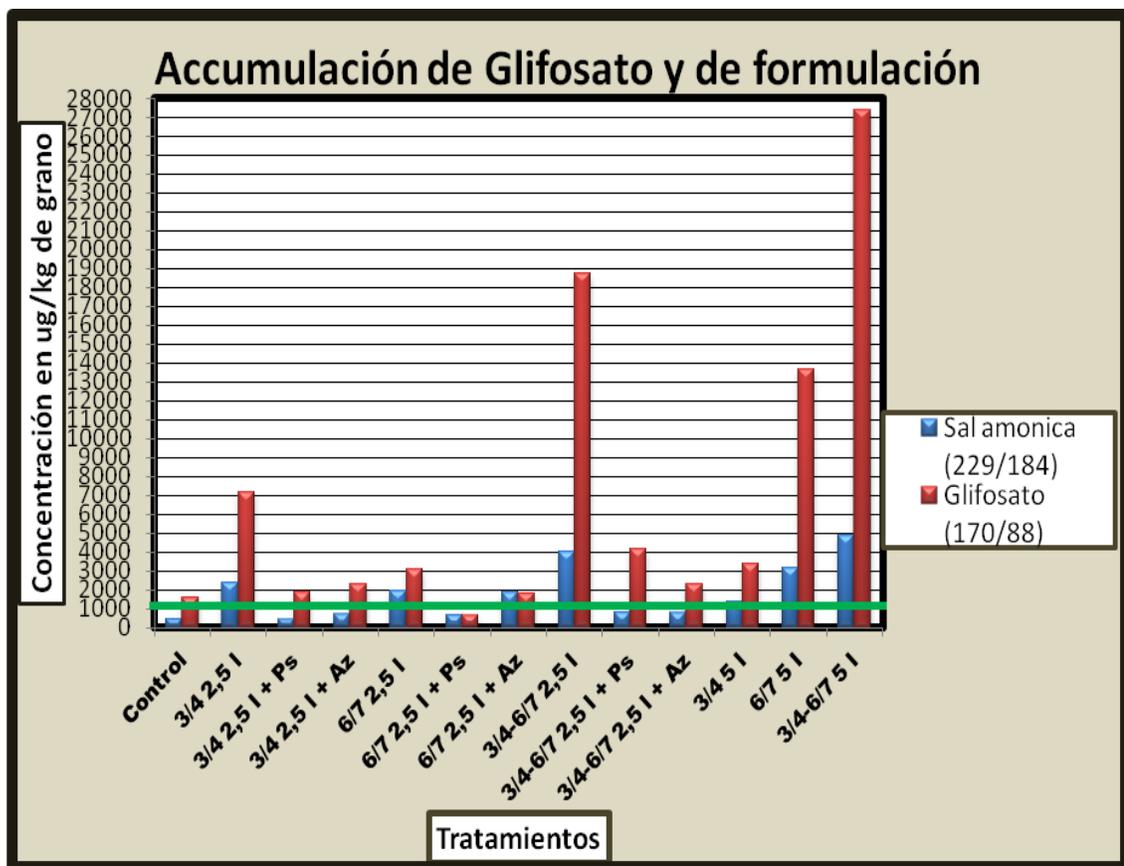


Figura 7: Concentración de glifosato y de la sal amónica en todos los tratamientos realizados. La línea color verde marca el límite admisible dispuesto por SAGPyA

Se puede observar en la figura 7, que los tratamientos de 3/4 hojas con 2,5 lts/ha, el de 3/4-6/7 hojas a la misma dosis, como así también los tratamientos de 6/7 hojas y 3/4-6/7 hojas con 5 lts/ha superan el límite admisible por los entes reguladores nacionales (1 mg/kg de grano, línea verde).

Las concentraciones mayores de residuos se encontraron en los tratamientos en los que se efectuaron dos aplicaciones en dos estadios fenológicos distintos, es decir en V3 y en V6 respectivamente.

Inclusive el control se vio afectado por la deriva, lo cual da el indicio de que aunque no se realice una aplicación directa, el compuesto transportado por deriva también puede acumularse en el grano.

Cabe destacar que en muchos de los tratamientos se superó varias veces el límite exigido por la reglamentación, llegando a ser veintisiete veces mayor.

Los resultados del metabolito del glifosato, AMPA o aminometilfosfonico no se presentan, ya que si bien se encontró la presencia de los iones correspondientes, no se pudo cuantificar debido a que no se consiguió el estándar interno

Discusión

Con respecto a la primer hipótesis planteada, se confirmó la presencia de residuos de glifosato en grano de maíz, es decir, que existe una bioacumulación del principio activo que permanece en el órgano de cosecha luego de finalizado su ciclo ontogénico.

Si bien no se encontraron antecedentes en este aspecto con respecto a maíz, Arregui *et al.* (2003) y Lorenzatti *et al.* (2004) confirmaron la presencia de residuos del herbicida en cuestión, en tejidos vegetativos, granos y subproductos alimenticios de soja. En este sentido, cabe destacar que el grano de soja es sometido en su mayor parte a tratamientos fisicoquímicos para extracción de aceite, lo cual produce modificaciones en la estructura de la molécula residual y en consecuencia disminuye la concentración del producto en grano antes de ser utilizada para alimentación humana o animal (Lorenzatti *et al.* 2004). En cambio, al ser un cereal, el maíz se utiliza en su mayor proporción para alimento animal previo un simple tratamiento de molienda que no afecta la composición química del residuo en cuestión.

Con respecto a la segunda hipótesis, se pudo observar y confirmar a través de análisis estadísticos que a mayor dosis, la concentración de residuo en grano es mayor.

En cuanto a los momentos de aplicación, los resultados confirmaron que con dos aplicaciones en dos estadios fenológicos diferentes, la concentración aumenta en forma significativa, este aumento de concentración de residuo ante mayor cantidad de aplicaciones coincide con lo encontrado en soja por Arregui *et al.* (2003).

En cuanto a las aplicaciones en distintos estadios fenológicos en el estadio más avanzado la concentración de residuo en grano fue menor, según lo que arrojan los resultados estadísticos. Esto puede deberse a la mayor cantidad de biomasa presente en la planta, la que podría estar distribuyendo en forma diferente el herbicida al momento de traslocarlo. De todas maneras, dado que la media o promedio del estadio fenológico más avanzado dio una mayor concentración de residuos que no se refleja en el análisis estadístico, sería recomendable repetir este tipo de tratamiento en futuros trabajos ya que no existen antecedentes bibliográficos para este cultivo y con este herbicida que permitan comparar los resultados obtenidos.

La tercer hipótesis planteada respecto a que las concentraciones halladas en los granos de maíz superarían los límites establecidos por SAGPyA y SENASA, fue confirmada, ya que se encontró que en casi todos los tratamientos se superaba el límite de 1mg/kg de grano, siendo superado hasta 27 veces en el tratamiento con dos aplicaciones a mayor concentración, es decir, 5 lts/ha.

La cuarta y última hipótesis que apuntaba a confirmar que la aplicación foliar de dos bacterias PGPR (*Azospirillum* y *Pseudomonas*) podían disminuir la concentración en grano del residuo de glifosato por medio de su actividad metabólica, también fue comprobada para los tratamientos de una y dos aplicaciones con 2,5 lts/ha. Esta capacidad detoxificante de ambas bacterias fue confirmada por Fortuna J. *et al.*, (2013) al realizar un análisis en plántulas de maíz en laboratorio, obteniendo un resultado similar al hallado en el presente ensayo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos bacterias utilizadas, lo que sugiere que podrían estar utilizándose cualquiera de las dos, por lo que el productor debería basar su decisión en otros parámetros como por ejemplo el impacto en el rendimiento final del cultivo.

CONCLUSIONES

A modo de conclusión, se puede afirmar que el presente trabajo demuestra por primera vez, que el herbicida Glifosato no solo se bioacumula en el órgano de cosecha del cultivo de maíz, sino que esa bioacumulación es mas acentuada a medida que la concentración utilizada es mayor y la cantidad de aplicaciones es mayor .

Además, se confirma que las bacterias PGPR no solo otorgan los beneficios ya comprobados de aumento de rendimientos y sanidad vegetal por medio de distintas vías fisiológicas como por ejemplo la producción de fitohormonas, sino que también pueden desempeñar un papel fundamental y hasta ahora desconocido en el cuidado ambiental, reduciendo el impacto negativo de la contaminación química por los productos utilizadas en la agricultura moderna.

Muchas veces se habla de buenas prácticas agrícolas, el SENASA dice que las mismas “consisten en la aplicación del conocimiento disponible a la utilización sostenible de los recursos naturales básicos para la producción, en forma benévola, de productos agrícolas alimentarios y no alimentarios, inocuos y saludables, a la vez que se procura la viabilidad económica y la estabilidad social” SENASA (2010). Es llamativo que el estudio de un herbicida tan ampliamente utilizado desde hace tiempo y en grandes superficies, no cuente con bibliografía suficiente en un tema tan importante para la salud como es la acumulación en los órganos de cosecha destinado tanto a consumo animal como humano. Esta información permite conocer a fondo las herramientas químicas que se están utilizando para la producción de alimentos, lo que nos va a ayudar a utilizar correctamente las mismas, ya que si ignoramos como funcionan, nunca vamos a poder a utilizarlas correctamente.

Los resultados de este ensayo sugieren por ejemplo, que mientras más concentración use, mas se acumulará, se debería determinar por tanto, cual es la dosis promedio indicada que permita solucionar el problema de las malezas y que a su vez no conlleve una concentración en grano que supere los límites establecidos. Otro aspecto importante a destacar para proponer una buena práctica agrícola, es el contemplar que si se realiza más de una aplicación, se debe tener en cuenta que estas son aditivas con respecto a la concentración de residuos en grano y por lo tanto, se debe analizar cuidadosamente cual debería ser la dosis a utilizar en cada momento.

También se podría estar sugiriendo como buena práctica agrícola, la incorporación de bacterias PGPR como complemento, en caso de utilizar glifosato dentro del planteo de protección de cultivo, por los beneficios ya nombrados anteriormente.

En definitiva, este trabajo pretende sentar las bases de la necesidad de un mayor control, con el fin de conocer realmente los insumos usados en la producción agropecuaria y sin quedarnos solamente con lo que la empresa productora dice al respecto de los mismos. Es responsabilidad de las instituciones públicas el confirmar o refutar aspectos relevantes de estas herramientas, ya que son estas, quienes están comprometidas en salvaguardar la salud pública así como también la sustentabilidad alimentaria del territorio

BIBLIOGRAFÍA

ARREGUI, C A., LENARDÓN D. SÁNCHEZ, M.I. MAITRE, R.SCOTTA & S.ENRIQUE (2003): “Monitoring Glyphosate Residues in Transgenic Glyphosate Soyben.” *Pest Mang. Sci* 163-167.

BEZBARUAH, B., SAIKIA, N Y BORA, T. (1995). Effect of pesticidas on most probable number of soil microbes from tea (*Camellia sinensis*) plantations and uncultivated land enumerated in enrichment media. *India J. of Agric. Sciences* 65(8): 578 – 583.

BLUM K, NOBLE EP, SHERIDAN PJ, FINELY O, MONTGOMERY A, RITCHIC T, OZKARAGOZ T, FITCH RJ, SADLACK F, SHEFFIELD D, DAHLMANN T, LLALBARDIER S, NOGAMI H (1991): Association of the A I allele of the D., dopamine receptor gone with severe alcoholism. *Alcohol* 8:409--416.

BOLOGNESI C., BONATTI S., DEGAN P., GALLERANI E., PELUSSO M., RABBONI R., ROGGIERI P., ABBONDANDOLO A., (1997). *Genotoxic activity of glyphosate and its commercial formulation Roundup*. *J. Agric Food Chem.* 45: 1957-1962.

CASAFE (2009) <http://www.casafe.org/biblioteca/estadisticas/>

CISNEROS, J; A. CANTERO y C. CHOLAKY. 2000. *Uso y Manejo de Suelos*. Facultad de Agronomía y Veterinaria. UNRC. Río Cuarto, Córdoba. p:41.

CODEX ALIMENTARIUS (1997). Comisión del Codex Alimentarius. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. 1997; Disponible en URL: <http://www.fao.org/waicent/faostat/Pest-Residue/pest-s.htm>

CONICET (2009): Evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. Decreto 21/2009.

DAVIES PJ (2004) *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action*. Kluwer Academic Press, the Netherlands.

DOBEREINER J., (1997). *Biological nitrogen fixation in tropics: Social and economic contribution*. Soil Biol. Biochem., 29: 771-774.

DYER W.E.,(1994) Resistance to glyphosate, in *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*, ed by Powles S and Holtum J, Lewis Publishers, New York, pp 229-241.

EBERBACH, P.L. Y DOUGLAS, L.A. (1983). Persistence of glyphosate in sandy loam. Soil Biol. Biochem. 15(4).

EBERBACH, P.L., DOUGLAS, L.A., (1989). Herbicide effects on the growth and nodulation potential of *Rhizobium trifolii* with *Trifolium subterraneum*. Plant Soil 119, 15–23.

ESITKEN, A., PIRLAK, L., TURAN, M., SAHIN, F., (2006). Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. Sci. Hortic. 110, 324–327.

EUROPEAN COMMISSION (2002). Glyphosate 6511/VI/99-final 21 January 2002. Health and Consumer Protection Directorate-General Directorate E – Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions. E1 - Plant health. 2002. Disponible en [URL:http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1_glyphosate_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1_glyphosate_en.pdf).

FORTUNA J.B., CARDOZO P., REINOSO H., TRAVAGLIA C. (2013). Study of the Biostimulant and Detoxificant Capacity of Inoculated *Azospirillum* sp in the Early Growth Stage of Corn. Resumen publicado en la revista científica BIOCELL, formerly Electron Microscopy and Cell Biology ISSN 0327-9545 (print), ISSN 1667-5746 (electronic)

FORLANI G. MANTELLI M, BRANZONI M, NIELSEN E Y FAVILLI F. (1995). Differential sensitivity of plant-associated bacteria to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. Plant and Soil. Vol. 176: 243-253. The Netherlands.

FRANZ, J.E., M.K. MAO AND J.A. SIKORSKI. (1997). Glyphosate: A Unique Global Herbicide. American Chemical Society. Chap. 4 pp. 65-97

HAAHTELA K., LAAKSO T., NURMIAHO-LASSILA E. AND KORHONEN T., (1988). *Effects of inoculation of Poa pratensis and Triticum aestivum with root-associated, N₂-fixing Klebsiella, Enterobacter and Azospirillum.* Plant Soil 106: 239-248.

HECHT-BUCHOLZ (1998). The apoplast-habitat of endophytic dinitrogen-fixing bacteria and their significance for the nitrogen nutrition of non leguminous plants. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 161: 509-520.

HUTCHINSON, G.I. (1995), Nitrogen Cycle Interactions with Global Change Processes. In Niertenberg, W.I. (Ed) Encyclopedia of Environmental Biology. Volume 2 San Diego, Academic press. Pp. 583-587

INTA (2010): Aspectos ambientales del uso del glifosato, Estacion experimental agropecuaria Balcarce.

JARVINEN A. AND ANKLEY G., (1999). *Linkage of effects to tissue residues: Development of a comprehensive database for aquatic organisms exposed to inorganic and organic chemicals.* SETAC Press, pp. 1-358.

LORENZATTI E (2006). “Estudio de Residuos de Endosulfán y Glifosato en la Producción y Procesado de Soja Transgénica (Glycine max). Tesis Doctoral. Univers. Politécnica de Valencia. Departamento de Tecnología de Alimentos. España 216 pag.

LORENZATTI E.; M.I. MAITRE. A. LENARDÓN, R. LAJMANOVICH; P. PELTZER; M. ANGLADA (2004) “Pesticides Residues in Immature Soybeans of Argentina Croplands” Fresenius Environmental Bulletin: 13, 7, 675-678.

MASCIARELLI O. (2010). *Nuevos métodos para estudiar el rol del AIA en sobrenadantes de cultivos de Azospirillum brasilense. Impacto sobre el control de calidad de inoculantes comerciales.* Tesis para optar al Título de Magister en Biotecnología, UNRC Octubre 5.

MASCIARELLI, O.; URBANI, L.; REINOSO, H., AND LUNA V. (2013). Microbial strategy to understand the role of indol-3-acetic acid in supernatans of *Azospirillum brasilense*. The Journal of Microbiology. DOI 10.1007/s12275-013-3136-3

OMAR M., BERGE O., HASSANEIN E., Y SHALAN S., (1992) *In vitro and in situ effects of herbicide thiobencarb on rice-Azospirillum association.* Symbiosis 13: 55-63.

PERRIG D., BOIERO L., MASCIARELLI O., PENNA C., CASSÁN F. AND LUNA V., (2007) *Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of Azospirillum brasilense, and their implications for inoculant formulation.* Applied Microbiology and Biotechnology (2007). 75: 1143-1150.

PETER J. DAVIES, (2004). *Plant Hormones, Biosynthesis, Signal the Transduction and Action.* Kluwer Academic Publishers.

REIS, D. J., GOLANOV, E. V., RUGGIERO, D. A. & SUN, M.-K. (1994). *Sympatho-excitatory neurons of the rostral ventrolateral medulla are oxygen sensors and essential elements in the tonic and reflex control of the systemic and cerebral circulations.* Journal of Hypertension 12, S159—S180.

RITCHIE, S. W.; HANWAY & BENSON G. O. (1993). *How a corn plant develops.* Special Report 48. Iowa State University.

SAGPYA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (2005). Las Normas de Higiene Alimentaria y sus implicancias para Argentina..

SATORRE E. H. , BENECH ARNOLD R. L., SLAFER G., DE LA FUENTE E., MIRALLES D. J., OTEGUI M. E. & SAVIN R. (2003) Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. Facultad de Agronomía , Universidad de Buenos Aires. Pags 136-139

SEILER, R., R. FABRICIUS , V. ROTONDO y M. VINOCUR. (1995). Agroclimatología de Río Cuarto – 1974 / 1993. Volumen I. UNRC. p:41

SENASA (2008), Resolución N° 507/2008. Disponible en URL: <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to =n&in=185&io=6840>

SENASA (2010) Manual de buenas prácticas agrícolas http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File3896-manual-bpa_senasa_cbpa.pdf

SCHILLING G., GRANSEE A., DEUBEL A., LEZOVIC G., RUPPEL S. (1998). *Phosphorus availability, root exudates, and microbial activity in the rhizosphere*. Z. Pfl.-Ernähr. Bodenkde, 161: 465–478.

SMITH E. A, OEHME F.W. (1992), The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. *Vet Hum Toxicol* 34: 531-544 (1992).

SPYNU, E.I. (1989) "Predicting pesticide residues to reduce crop contamination". *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 109: 89–107

TRAVAGLIA, C.; REINOSO, H. & BOTTINI, R. (2009). Application of abscisic acid promotes yield in field-cultured soybean by enhancing production of carbohydrates and their allocation in seed. *Crop & Pasture Science*, 60, (1131–1136), ISSN 14449838

VANCE CP (1997). The molecular biology of nitrogen metabolism. in *Plant Metabolism*. eds Dennis DT, Turpin DH, Lefebvre DD, Layzell DB (Longman Scientific, Essex, UK), pp 449–476.

VENKATESWARLU K. AND SETHUNATHAN N., (1984). *Fate of ¹⁴C carbofuran in a flooded acid sulphate saline soil*. *Current Science* 53: 925-927. VILLALBA A., (2009). Resistencia a herbicidas. Glifosato*. *Ciencia, Docencia y Tecnología* N° 39, Año XX, noviembre de 2009. *Comunicaciones Ciencias Exactas y naturales* (169-186).

WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA (1994). Glyphosate. *Herbicide Handbook of the weed Science Society of America*, 7th. Edition, p150.

ZABLOTOWICZ R. AND REDDY K. (2004). *Impact of glyphosate on the Bradyrhizobium japonicum symbiosis with glyphosate-resistant transgenic*. *Journal of Environmental Quality*, 33:825-831.

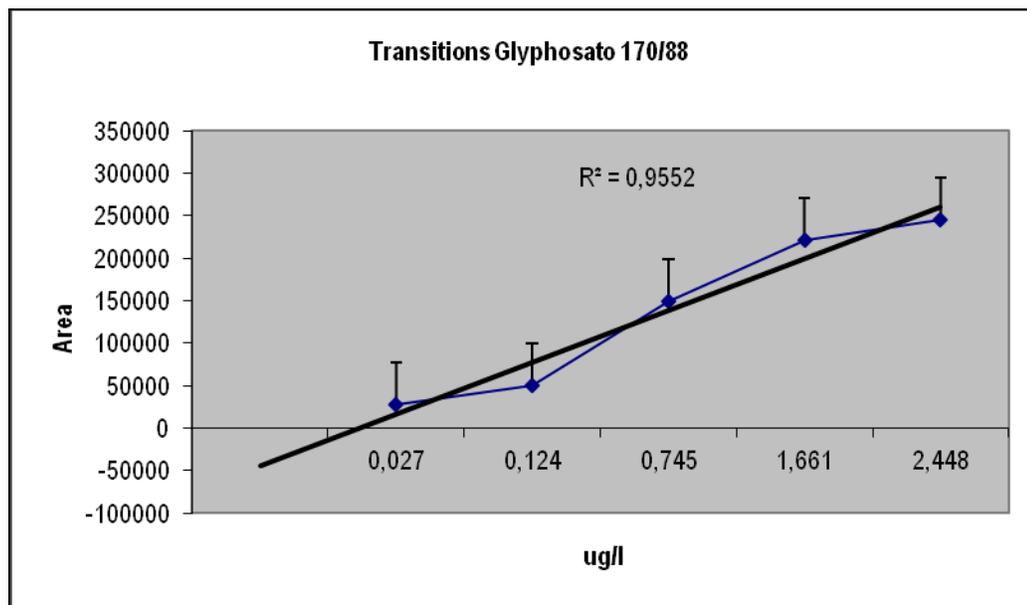
ZAHIR Z.A., ARSHAD M. AND FRANKENBERGER W. JR., (2004). *Plant growth promoting rhizobacteria: Applications and perspectives in agriculture*. *Adv. Agron.*, 81: 97-168.

ANEXOS

Tablas y curvas de calibración según estándar interno de la cromatografía líquida pasa a) Glifosato y b) Formulación

a)

Glifosato	ug/l	Area
G0		
G1	0,027	27464
G2	0,124	49806
G3	0,745	149085
G4	1,661	221446
G5	2,448	244843



b)

Formulación	ug/l	Area
R0		
R1	0,005	5266
R2	0,021	8469
R3	0,126	25240
R4	0,382	50949
R5	0,535	53501

