

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Micología, Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, para optar el título de Microbiólogo



"Determinación de la tolerancia y degradación del herbicida glifosato por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* no toxicogénicas nativas de suelos agrícolas"

Juan Pablo Regñicoli

Directora: Dra. Carina Magnoli
Co-directora: Mic. Cecilia Soledad Carranza

Diciembre 2017

Aprobado por el jurado:

.....
Dra. Carina Magnoli

.....
Dra. María Alejandra Passone

.....
Dr. Fernando Ibañez

Resumen

Nuestro país es uno de los líderes mundiales en el uso de cultivos genéticamente modificados en la agricultura, con 24,5 millones de hectáreas sembradas con cultivos con diferentes combinaciones de tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos. Cultivos como soja y maíz con tolerancia al glifosato (GP), están ampliamente distribuidos en nuestra región, con la repetida incorporación del herbicida al suelo. En los últimos años ha comenzado a tener mayor importancia la acumulación de GP en ambientes naturales (tanto agua como suelo) y sus potenciales riesgos toxicológicos sobre animales, humanos y medio ambiente. El metabolismo microbiano ha tomado gran importancia en la degradación de los herbicidas, siendo los hongos filamentosos, una importante herramienta en la biorremediación de estos compuestos tóxicos. El género *Aspergillus*, propuesto como agente de biorremediación, es capaz de utilizar el GP como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno para su crecimiento. En este trabajo se planteó la siguiente hipótesis: la cepa de *Aspergillus oryzae* AM₁ no toxicogénica aislada de suelo destinado al cultivo de soja y maíz tolera y degrada el herbicida GP bajo condiciones *in vitro* y en microcosmos. Los objetivos específicos desarrollados fueron: a) Evaluar *in vitro* la capacidad de degradar diferentes dosis de GP por la cepa *Aspergillus oryzae* AM₁ no toxicogénica, b) determinar en ensayos en microcosmos, la evolución de la microbiota nativa del suelo a través del tiempo en presencia de diferentes dosis de GP, c) evaluar la tolerancia al GP de la cepa *A. oryzae* AM₁ en interacción con la microbiota nativa de suelo en ensayos en microcosmos. Los resultados obtenidos mostraron que en los ensayos de remoción de GP *in vitro* la cepa de *A. oryzae* fue capaz de remover la concentración de GP más alta ensayada (10 mM) en condiciones de actividad de agua (a_w) óptimas para el crecimiento (0,99 y 0,98), mientras que a 0,95, no se observó remoción en ninguna de las dosis del herbicida. Los géneros más frecuentemente aislados de suelos expuestos a GP fueron *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp. y *Trichoderma* sp. Los recuentos de los géneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. no se vieron afectados significativamente por las dosis del herbicida ensayadas, mientras que los recuentos de *Trichoderma* sp. fueron superiores en la condición control y los de *Mucor* sp., en presencia de la concentración de GP más alta. El recuento de la cepa de *A. oryzae* AM₁, no se vio afectado por las dosis de GP ensayadas y, además, se observó que esta cepa fue capaz de mantenerse viable a lo largo de todo el período de incubación en presencia de la microbiota nativa del suelo. Los resultados obtenidos sugieren que la cepa *A. oryzae* AM₁ presenta potencial para ser aplicada al suelo como posible agente de biorremediación, debido a su capacidad de tolerar y degradar el herbicida.

Este trabajo se realizó en el marco de una beca de ayudantía de Investigación de la Secretaría de Ciencia y Técnica-UNRC, con el título: "Tolerancia y degradación del plaguicida glifosato por cepas fúngicas aisladas de suelos agrícolas". Res N° 443/16, Período 01/04/16 al 31/03/17. Renovación hasta 31/03/2018. Directora: Dra. Carina Magnoli, Co-directora: Mic. Cecilia Carranza.

Agradecimientos

A mis papás, gracias por todo el esfuerzo que hacen todos los días para poder estar hoy en esta etapa. Por todo su trabajo para que nunca me falte nada y poder dedicarme enteramente al estudio, por el apoyo y contención en cada instancia de la carrera, por inculcarme tantas enseñanzas y valores a lo largo de mi vida y acompañarme de la manera que lo hacen siempre, ojalá algún día llegue a ser todo lo que significan ustedes para mí. También a mi hermano, que a pesar de la distancia siempre está presente y acompañándome más que nunca.

A mis segundos papás, mis abuelos, los que me miman desde siempre. Gracias a los cuatro por cuidarme tanto. A mi abuela Julia y mi abuelo Pichón, que me acompañan día a día, que con toda su ayuda hicieron que yo esté acá hoy, y que a mis papas les sea un poco más fácil darnos esta gran oportunidad. Gracias por todo su cariño y su amor, por hacerme sentir tan feliz en cada momento que comparto con ustedes. A mi abuela Lucy y mi abuelo Nino, que a pesar de no tenerlos físicamente sé que siempre están al lado mío acompañándome en cada paso de mi vida. En especial a vos, mi abuela, que te me fuiste cuando comenzaba esto, que pudiste compartir algunos momentos conmigo, que te ponías tan feliz por mis logros, sé que estarías muy orgullosa en este momento. ¡Gracias y gracias a los cuatro! Los amo.

Al resto de mi familia, mis tíos y primos, que me brindan siempre su mejor apoyo y cariño, especialmente a mis tíos Silvana y Daniel, que me cuidaron y ayudaron tanto estos años, abriéndome siempre las puertas de su casa en todo momento, haciendo que esta nueva etapa que comenzaba sea más fácil de transitar.

A los grandes amigos que me regalo la universidad, mis cuatro pollos, Karmen, Sofi, Lu y Dari. Gracias por haber hecho de estos años los mejores, por tantas risas, pasadas de largo, (salvo ya sabemos quién), por haber compartido tantas horas de "estudio" siempre con comida y largos descansos de por medio, por tantas juntadas a comer hasta no dar más salvo, el Dari que todavía debe estar comiendo (me hicieron cocinar tanto estos años).

Hicieron que los momentos que parecían más difíciles, tantos parciales, tantos finales, pasen mucho más fáciles porque siempre había algo para reír. Espero que sigan siempre como las buenas personas que son, y que sigamos compartiendo esta gran amistad para toda la vida. ¡Salud y chchchchchchc hasta que me deje de deshidratar del hambre!

A mis amigos de siempre, los que nos conocemos de chicos y no tan chicos, Mila, Santi, Pini, Orne, Jose, Ana, Manzo, Gwen, Fer, Fede, que a pesar de la distancia y de que los tiempos juntos sean menos, sigamos teniendo esa amistad de siempre y compartiendo tantos momentos juntos. Gracias por el apoyo de todos estos años y por compartir este momento tan importante conmigo.

Agradecer también a Ceci, Carla, Nico y Cari, por la paciencia que tuvieron al enseñarme todo lo que aprendí estos años. Por brindarme tiempo de su trabajo para sentirme seguro y confiado con el hermoso trabajo realizado que hoy termina. Gracias por trasmitirme su conocimiento y ser un excelente grupo.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por el espacio brindado para formarme y crecer tanto profesional como personalmente.

Índice

I- Introducción	1
I-1. Producción agrícola en Argentina	1
I.2. Cultivos genéticamente modificados	2
I.2.1. Generalidades	2
I.2.2. Cultivos genéticamente modificados en Argentina	2
I-3. Resistencia a plaguicidas	5
I-3.1. Generalidades	5
I-3.2. Cultivos resistentes a plaguicidas	5
I-3.3. Cultivos principales y plaguicidas más usados en Argentina	6
I-4. Glifosato	6
I-4.1. Generalidades	6
I-4.2. Mecanismo de acción	7
I-4.3. Efectos del glifosato	9
I-4.3.1. En el medio ambiente	9
I-4.3.2. En la salud	9
I-4.3.3. En los microorganismos del suelo	10
I-4.4. Comportamiento del glifosato en el suelo	11
I-4.4.1. Movilidad	11
I-4.4.2. Degradación	12
I-4.4.2.1. Biodegradación por la microbiota nativa de suelos agrícolas	13
I-5. Género <i>Aspergillus</i>	14
I-5.1. Generalidades	14
I-5.2. Taxonomía e identificación del género <i>Aspergillus</i>	15
I-5.3. <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	17
II- Hipótesis	20
III- Objetivos	20
III-1. Objetivo general	20
III-2. Objetivos específicos	20
IV- Materiales	21
IV-1. Medios de cultivo	21
IV-2. Soluciones	21
V- Metodología	23
V-1. Evaluación de la capacidad de remoción de glifosato <i>in vitro</i> por <i>Aspergillus oryzae</i> AM ₁	23

V-1.1. Determinación de la concentración de glifosato residual y la presencia de su principal metabolito de degradación (AMPA) en el medio de cultivo.....	23
V-2. Evaluación de la tolerancia a glifosato por la cepa <i>Aspergillus oryzae</i> (AM ₁) en presencia de la micobiota nativa.....	24
V-2.1. Preparación de los microcosmos.....	24
V-2.2. Inoculación de los microcosmos.....	25
V-2.3. Aislamiento, recuento e identificación fúngica.....	25
V-3. Análisis estadístico de los datos.....	26
VI-Resultados y discusión.....	28
VI-1. Evaluación de la remoción <i>in vitro</i> de diferentes dosis de glifosato por la cepa <i>A. oryzae</i> AM ₁	28
VI-2. Evaluación de la tolerancia a glifosato de la micobiota nativa en ensayos en microcosmos de suelo agrícola.....	36
VI-2.1. Evaluación de la tolerancia a glifosato por la cepa <i>A. oryzae</i> AM ₁ en presencia de la micobiota nativa.	54
VII- Conclusiones.....	61
VIII- Bibliografía.....	62
VIX- Anexo estadístico.....	72

I- Introducción

I-1. Producción agrícola en Argentina

En Argentina, el área total de tierra sembrada durante la campaña 2016/2017 alcanzó los 39 millones de hectáreas, distribuidas en tres grandes grupos de cultivos: cereales, principalmente maíz, trigo, avena, cebada y sorgo; oleaginosas, siendo los más cultivados la soja y el girasol; y otros cultivos de menor magnitud, pero con gran importancia como el algodón y el maní (Ministerio de Agroindustria, 2017).

La producción de soja es una de las principales fuentes económicas del país, alcanzando en la campaña 2016/2017, una superficie sembrada de 19,2 millones de hectáreas, siendo las principales áreas productoras las provincias de Córdoba, Santa Fe y el norte de Buenos Aires, junto con las zonas secundarias de las provincias de Salta, Tucumán y Santiago del Estero (Bolsa de Cereales, 2017). Para la campaña actual, se estima una producción de 56,5 millones de toneladas, ubicando al país, como tercer productor mundial, después de Estados Unidos y Brasil (INTA, 2017). Además del grano, Argentina se ubica como primer exportador mundial de aceite y harina de soja y primer productor mundial de biodiesel en base al aceite de soja, obteniendo así una mayor expansión en el mercado internacional y gran relevancia económica que se mantiene en aumento durante los años (Bolsa de Comercio de Rosario, 2016).

En cuanto a la producción de maíz, se espera alcanzar para la campaña actual las 37 millones de toneladas, el segundo gran aporte económico para el país. La superficie de siembra esperada alcanzar durante la campaña actual es de 4,9 millones de hectáreas, distribuidas en las principales áreas productoras en las provincias de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires y Entre Ríos, junto con otras áreas secundarias como lo son parte de las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán y Formosa. Para este cereal, Argentina es el segundo exportador a nivel mundial después de los Estados Unidos (Bolsa de Cereales, 2017).

En la producción de maní, Argentina es uno de los principales exportadores junto a China y Estados Unidos, ocupando el primer lugar en la exportación de maní de primera calidad o maní confitería. La superficie sembrada en el país, ocupa aproximadamente 300.000 hectáreas, esperando alcanzar en la campaña actual 1,1 millones de toneladas producidas. El 90% de las tierras de cultivo de maní se ubican en el sur de la provincia de Córdoba, junto con San Luis, La Pampa y Salta (Olega, 2017).

I.2. Cultivos genéticamente modificados

I.2.1. Generalidades

Se entiende por cultivos genéticamente modificados (GM) a aquellas plantas cuyos genes fueron modificados mediante ingeniería genética. La modificación introducida le otorga nuevas características beneficiosas como: resistencia a enfermedades, virus, bacterias, hongos, plagas, tolerancia a herbicidas y a situaciones de estrés como pueden ser sequías, heladas y altas temperaturas. Además, puede contribuir a cambiar los rasgos nutricionales de frutos o semillas, por ejemplo, aumentar el contenido de vitaminas, la proporción de ácidos grasos o aceites saludables. Esto se logra mediante la introducción de uno o más genes nuevos o mediante la modificación de uno preexistente, propio de la planta, teniendo esa modificación la capacidad de ser heredable, es decir, de transmitirse a la descendencia (Esperbent, 2016).

I.2.2. Cultivos genéticamente modificados en Argentina

Argentina es uno de los países líderes a nivel mundial en el uso de cultivos GM en la agricultura. Actualmente se cultivan unas 24,5 millones de hectáreas de estos cultivos con distintas combinaciones de tolerancia a herbicida y resistencia a insectos (**Figura 1**). La incorporación de estas tecnologías comenzó en la década del 90 y ha continuado hasta el presente, donde Argentina se mantiene como el tercer productor mundial, detrás de EEUU y Brasil en cuanto a su uso (James, 2015).

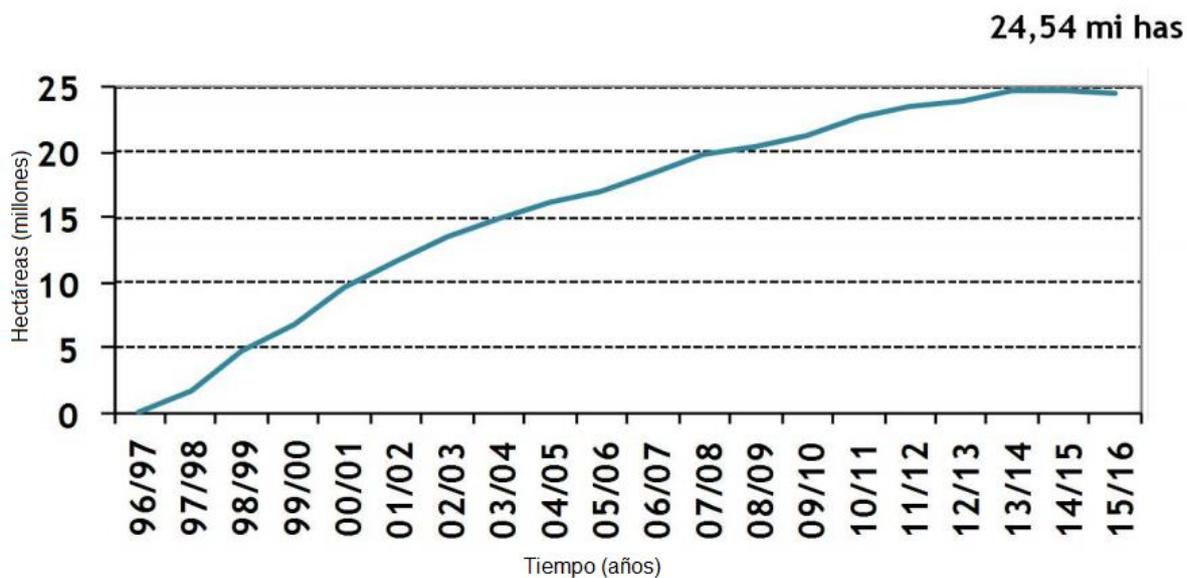


Figura 1. Evolución de la superficie sembrada con cultivos GM en Argentina (en millones de hectáreas) (ArgenBio, 2016).

En Argentina, los únicos cultivos transgénicos autorizados, hasta el momento, son el maíz, el algodón y la soja. Los mismos han sido modificados con diferentes características, las cuales se detallan en la **tabla 1**.

Tabla 1. Cultivos transgénicos autorizados en Argentina (ArgenBio, 2016).

Cultivo	Característica introducida
Soja	Tolerancia al herbicida glifosato
	Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio
	Resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia a glifosato
	Tolerancia a herbicidas imidazolinonas
Maíz	Resistencia a insectos lepidópteros
	Resistencia a insectos coleópteros
	Tolerancia a glifosato
	Tolerancia a glufosinato de amonio
	Tolerancia a glufosinato de amonio y resistencia a lepidópteros
	Tolerancia a glifosato y resistencia a coleópteros
	Tolerancia a glifosato y resistencia a lepidópteros, acumulados por cruzamiento
	Tolerancia a glifosato y resistencia a lepidópteros y coleópteros
	Resistencia a Lepidópteros y tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio, acumulados por cruzamiento
Resistencia a coleópteros y lepidópteros, y tolerancia a glifosato y glufosinato de amonio	
Algodón	Tolerancia a glifosato y a herbicidas inhibidores de la Aceto Lactato Sintetasa
	Resistencia a lepidópteros
	Tolerancia a glifosato
	Resistencia a lepidópteros y tolerancia a glifosato

I-3. Resistencia a plaguicidas

I-3.1. Generalidades

Se entiende por plaguicida o pesticida a cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales. También contempla a aquellas sustancias que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos (FAO, 2006).

I-3.2. Cultivos resistentes a plaguicidas

La obtención de plantas cultivadas con tolerancia a plaguicidas se basa en la introducción de genes en la planta que degradan e inactivan al plaguicida o genes que codifican una versión insensible de la proteína de la planta que es el blanco de acción del plaguicida. Por ejemplo, la tolerancia al herbicida fosfinotricina (Basta®) se basa en el primer principio mencionado y la resistencia al herbicida glifosato (Roundup®) responde a la segunda estrategia (Olmedo, 1998).

El uso de cultivos resistentes permitió obtener varios beneficios, ya que el crecimiento de las malezas disminuye drásticamente el rendimiento y la calidad de los cultivos. Además, con estos cultivos se pueden emplear métodos de labranza más conservacionistas, como la siembra directa, que ayuda a la conservación del suelo y a la humedad, simplifica el manejo y reduce los costos de producción. Junto con esto, se ha logrado reemplazar plaguicidas con un perfil ambiental desfavorable por otras formulaciones químicas más saludables (ArgenBio, 2016).

Contrariamente, existen ciertos riesgos en el uso de este tipo de cultivos. El flujo de genes de un cultivo a otro o a especies emparentadas es una vía para el desarrollo de poblaciones de malezas resistentes en el campo. Una vez que el gen de resistencia es transferido naturalmente a malezas vinculadas al ambiente del cultivo, pueden crecer fácilmente libres de competencia esparciéndose rápidamente por el área del cultivo. Además, la aplicación de dosis superiores a las recomendadas o repetidas durante el desarrollo del cultivo con el fin de evitar el crecimiento de malezas, favorece la aparición de la resistencia; junto con efectos adversos inmediatos y a largo plazo para la salud humana, el ambiente y la economía de los agricultores (Madsen y Streibig, 2004).

I-3.3. Cultivos principales y plaguicidas más usados en Argentina

En nuestro país, ciertos plaguicidas, tales como clorpirifos, glifosato y diclosulám son de vital importancia durante el desarrollo del cultivo de soja y maní, incorporándose en forma continua en el medio ambiente del suelo destinado al cultivo de estas oleaginosas. En el cultivo de maíz los plaguicidas más usados son glifosato, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y atrazina (INTA, 2015).

El uso de glifosato es especialmente indicado para el control de las malezas presentes en el rastreo del cultivo anterior, antes o inmediatamente después de la implementación de la siembra directa. Se recomienda esperar 2 a 3 días después de la cosecha para que las malezas recuperen la capacidad de absorber el herbicida y luego aplicar 2 a 4 L/ha del herbicida (Monsanto, 2015).

I-4. Glifosato

I-4.1. Generalidades

El glifosato (GP) es un herbicida de amplio espectro, no selectivo y post-emergente, cuya fórmula empírica es $C_3H_8NO_5P$ (N-fosfometilglicina), correspondiente a un ácido orgánico débil formado por una molécula de glicina y otra de fosfometilo (**Figura 2**). Su forma física es un polvo cristalino, blanco, inodoro, comercializado como principio activo de varias formulaciones comerciales, entre ellas, las más conocidas es el Roundup® de la compañía Monsanto (Burger y Fernandez, 2004). Pertenece al grupo de los organofosforados y se caracteriza por la presencia de una unión covalente y estable entre carbono y fósforo (C-P).

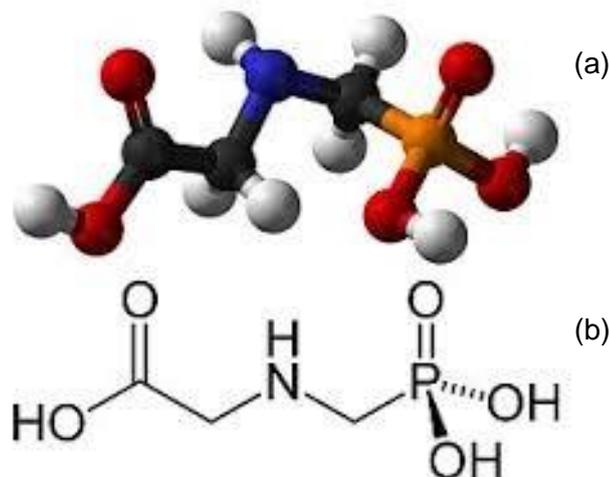


Figura 2: Estructura tridimensional (a) y química (b) del glifosato (CONICET, 2009; Monsanto, 2015)

I-4.2. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción del GP consiste en inhibir la síntesis de metabolitos esenciales en diferentes tipos de malezas como: *Pennisetum alopecuroides* (cola de zorro), *Amaranthus quitensis* (yuyo colorado), *Datura ferox* (chamico), *Sorghum halepense* (sorgo de Alepo), *Cynodon dactylon* (gramón), entre otras (Monsanto, 2015). Su acción es a través de la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintetasa (EPSPS). La EPSPS es codificada por el núcleo celular y transportada al cloroplasto a través de un péptido de transporte, y es en el cloroplasto donde participa de la ruta metabólica del ácido shikímico. Esta enzima está asociada a la síntesis de tres aminoácidos esenciales aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano (**Figura 3**). Además, esta vía está relacionada a la síntesis de compuestos aromáticos como ligninas, alcaloides, flavonoides, ácidos benzoicos y hormonas vegetales, puesto que los aminoácidos sintetizados son precursores de estos compuestos secundarios. El GP se transporta simplásticamente hacia los meristemas de la planta en crecimiento y, al actuar como inhibidor competitivo de la EPSPS, resulta en la acumulación de shikimato y en el bloqueo de la síntesis de los aminoácidos aromáticos (Pérez-Jones y col., 2007).

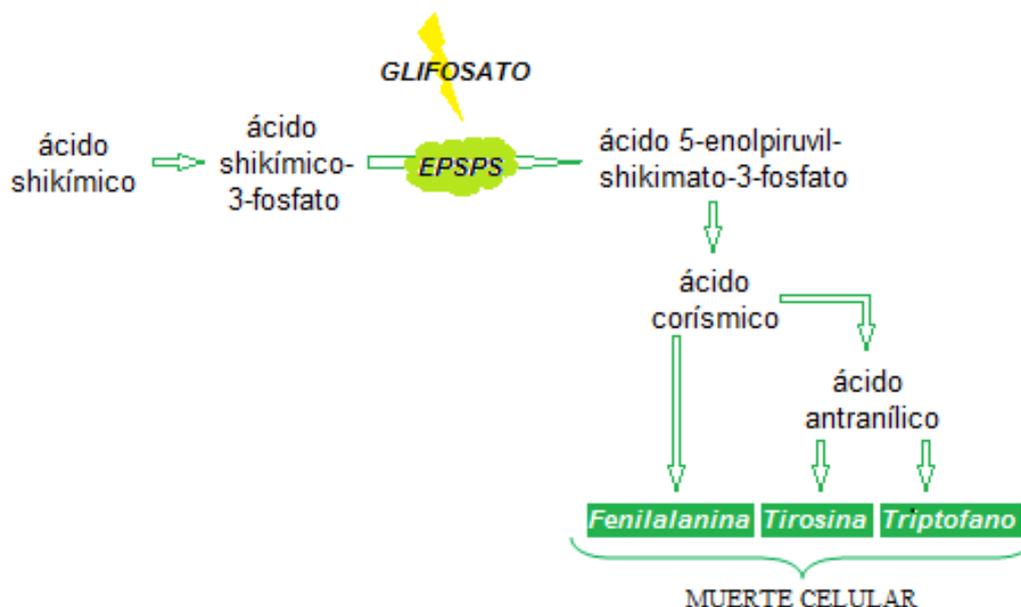


Figura 3. Mecanismo de acción del glifosato (Pérez-Jones y col., 2007)

El carácter sistémico del GP permite que el producto, luego de ser absorbido por el follaje, se distribuya a la planta entera a través de los tallos y raíces. 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. Los síntomas consisten en la pérdida de pigmentación de la planta, necrosis y muerte en días o semanas (Borjesson y col., 2008). Sin embargo, se han detectado residuos de GP y ácido aminometilfosónico (AMPA), principal metabolito de degradación del GP, en cultivos celulares de soja, en plantas y frutos de frutilla y de árboles forestales (Prata y col., 2003).

La resistencia de algunos cultivos a este herbicida se debe, por ejemplo, en el caso de la soja transgénica, a una integración estable de un transgen de *Agrobacterium* sp. que codifica la EPSPS resistente, manteniendo de esta manera niveles normales de aminoácidos aromáticos en la planta (Martínez y col., 2004).

I-4.3. Efectos del glifosato

I-4.3.1. En el medio ambiente

El GP es rápidamente adsorbido a las partículas del suelo donde su actividad es limitada, mientras que el GP libre es rápidamente degradado por los microorganismos (Giesy y col., 2000; Dong-Mei y col., 2004). 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. Sin embargo, la inactivación de este herbicida no es constante, debido a que se han observado daños en algunas especies de plantas producidos por su actividad residual. Uno de los principales problemas son los residuos remanentes de herbicidas que se acumulan, en particular luego de veranos secos, debido a que la degradación de los plaguicidas es más lenta en estas condiciones, pudiendo llegar a representar un riesgo de fitotoxicidad para los cultivos siguientes (Damalas y Eleftherohorinos, 2011; Huber, 2012).

Otras investigaciones advierten de los efectos negativos causados por el GP en el medio ambiente, comprendiendo, la reducción de la biodiversidad en suelos cultivables, cambios en la diversidad de malezas, así como la selección de malezas resistentes y cambios en las comunidades microbianas del suelo (EFSA, 2012). A pesar de los efectos analizados, el GP tiene un bajo impacto ambiental por unidad de ingrediente activo respecto de la mayoría de los herbicidas utilizados como fitosanitarios en los cultivos (Kovach y col., 2008).

I-4.3.2. En la salud

Las formulaciones comerciales que contienen GP varían en su concentración, desde el 48% al 79% o más de GP. En general son preparados acuosos obtenidos por la mezcla de la sal isopropilamina (IPA) de GP, surfactantes, y otros compuestos minoritarios como antiespumantes, colorantes, biocidas, iones inorgánicos y reguladores de pH. La intoxicación en humanos con estos herbicidas no es debida sólo al principio activo, sino que depende de la composición y concentración de los ingredientes de la mezcla. Es difícil separar la toxicidad del GP de los demás productos del formulado y, a su vez, considerar cuánto contribuye cada componente en la toxicidad total (Bradberry y col., 2004).

Como se mencionó antes, el GP inhibe una enzima que es esencial para el crecimiento de las plantas, pero no se encuentra en los seres humanos ni animales. Por lo tanto, su riesgo para la salud humana es relativamente bajo. Si analizamos las publicaciones sobre este herbicida, vemos que la toxicidad atribuida a GP es un tema controvertido. Por un lado, la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU (EPA), considera al GP con bajo potencial

cancerígeno, debido a la falta de evidencia de causar enfermedad en seres humanos (Monsanto, 2015; EPA, 2017). Igualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) en nuestro país lo consideran como un producto que no ofrece peligro para la salud (OMS, 2017; SENASA, 2017). Por otro lado, la Agencia internacional de Investigación del Cáncer (IARC) lo clasifica en el grupo 2A (posible carcinógeno para humanos), debido a limitadas evidencias de una asociación con el cáncer en seres humanos, pero con pruebas suficientes de asociación con el cáncer en animales de experimentación (IARC, 2017).

Otros investigadores sostienen que el GP produce efectos negativos en las personas. Se ha encontrado evidencia de que el Roundup® debe ser considerado como un potencial disruptor endócrino. Además, a dosis aún menores que las utilizadas en la agricultura, la toxicidad en las células placentarias induce problemas en la reproducción (Richard y col., 2005). Asimismo, se informó que el GP puede alterar la expresión de genes humanos que se hallan bajo control de los estrógenos (Hokanson y col., 2007). Investigaciones realizadas por Garry y col., (2002) muestran un aumento del riesgo de defectos de nacimiento y de anomalías en el desarrollo en hijos de aplicadores de plaguicidas. En cuanto al potencial carcinogénico del GP, estudios realizados en células humanas indicarían que puede alterar la estructura del ADN en células de mamíferos (Lueken y col., 2004; Mladinic y col., 2009).

I-4.3.3. En los microorganismos del suelo

Muchos estudios han evaluado los efectos del GP tanto en las actividades microbianas como en la agricultura. La mayoría de ellos no encuentran efectos significativos del herbicida en la actividad y estructura de los microorganismos (Accinelli y col., 2005; Gomez y col., 2009). Mientras que, otros informan un incremento en recuentos bacterianos y propágulos fúngicos (Ratcliff y col., 2006).

La capacidad del GP de adsorberse a las partículas del suelo y la movilidad a través de sus diferentes capas contribuyen a su acumulación en el suelo, modificando su disponibilidad para los microorganismos (Veiga y col., 2001). Se han realizado diferentes investigaciones, donde se puede observar que el GP produce diferentes efectos, ya sean positivos o negativos, sobre la microbiota del suelo. Según Haney y col. (2000) y Araújo y col. (2003) inmediatamente después de la aplicación del GP, se estimula la actividad microbiana resultando en una degradación rápida, aún en presencia de dosis altas aplicadas, sin afectar adversamente la actividad microbiana. Las aplicaciones de este herbicida pueden incrementar la mineralización neta, la nitrificación y las pérdidas potenciales de nitratos debido a la reducción de la inmovilización del nitrógeno por los microorganismos,

incrementando los riesgos de contaminación de las aguas subterráneas en suelos sometidos a la agricultura (Busse y col., 2001).

Contrariamente, otros autores sostienen que el GP puede ser utilizado como única fuente de carbono o fósforo, inhibiendo algunas poblaciones fúngicas del suelo y estimulando el crecimiento de otras, actuando así como un agente de selección ambiental (Krzysko-Lupicka y Sudol, 2008). Algunos autores sostienen que sólo un número limitado de especies de bacterias y hongos son capaces de crecer cuando el GP es adicionado como única fuente de fósforo en los medios de cultivo (Dick y Quinn, 1995).

Busse y col. (2001) observaron en sus investigaciones que las bacterias y los hongos cultivables disminuyeron en número o se inhibieron cuando se aislaron del suelo en un medio de cultivo sólido conteniendo GP. En este estudio se observó que los hongos particularmente son más sensibles que las bacterias al herbicida. La toxicidad en los medios artificiales es previsible por la naturaleza del GP, considerando que este compuesto puede tener actividad antimicrobiana. Las discrepancias entre los estudios de laboratorio y de campo se explican en parte por los diversos factores que influyen, tales como las concentraciones elevadas e irreales de GP utilizadas en los medios de cultivo y además, por la disminución de la biodisponibilidad del mismo en el suelo debido a la adsorción a las arcillas y a los óxidos de Fe y Al.

I-4.4. Comportamiento del glifosato en el suelo

I-4.4.1. Movilidad

Una vez en el suelo, hay diferentes procesos que determinan el destino final del GP:

- La formación de complejos con los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} presentes en el agua.
- La adsorción en sedimentos o partículas suspendidas en el agua y el suelo.
- El ingreso en el metabolismo de las plantas.
- Su biodegradación por microorganismos.
- El arrastre por escorrentía y la contaminación de fuentes de agua superficiales.

La retención del herbicida en el suelo es el principal proceso que regula su movilidad. El GP posee una alta afinidad por las partículas del suelo (CONICET, 2009). Las diferentes características físico-químicas de los suelos juegan un rol esencial en su adsorción. En particular su pH y su tenor de Fe, Al, Ca, P_2O_5 y materia orgánica (sobre todo en los suelos pobres en óxidos) (Zhou y col., 2004). Esta fuerte de adsorción se opone a su degradación, que es esencialmente de naturaleza biológica y puede dar lugar a persistencias relativamente largas. Sin embargo, ésta depende de la adsorción pero también de las condiciones

ambientales presentes (precipitaciones, temperatura, actividad microbiana, entre otros factores) (Braja y Alfonso, 2005) (**Figura 4**).

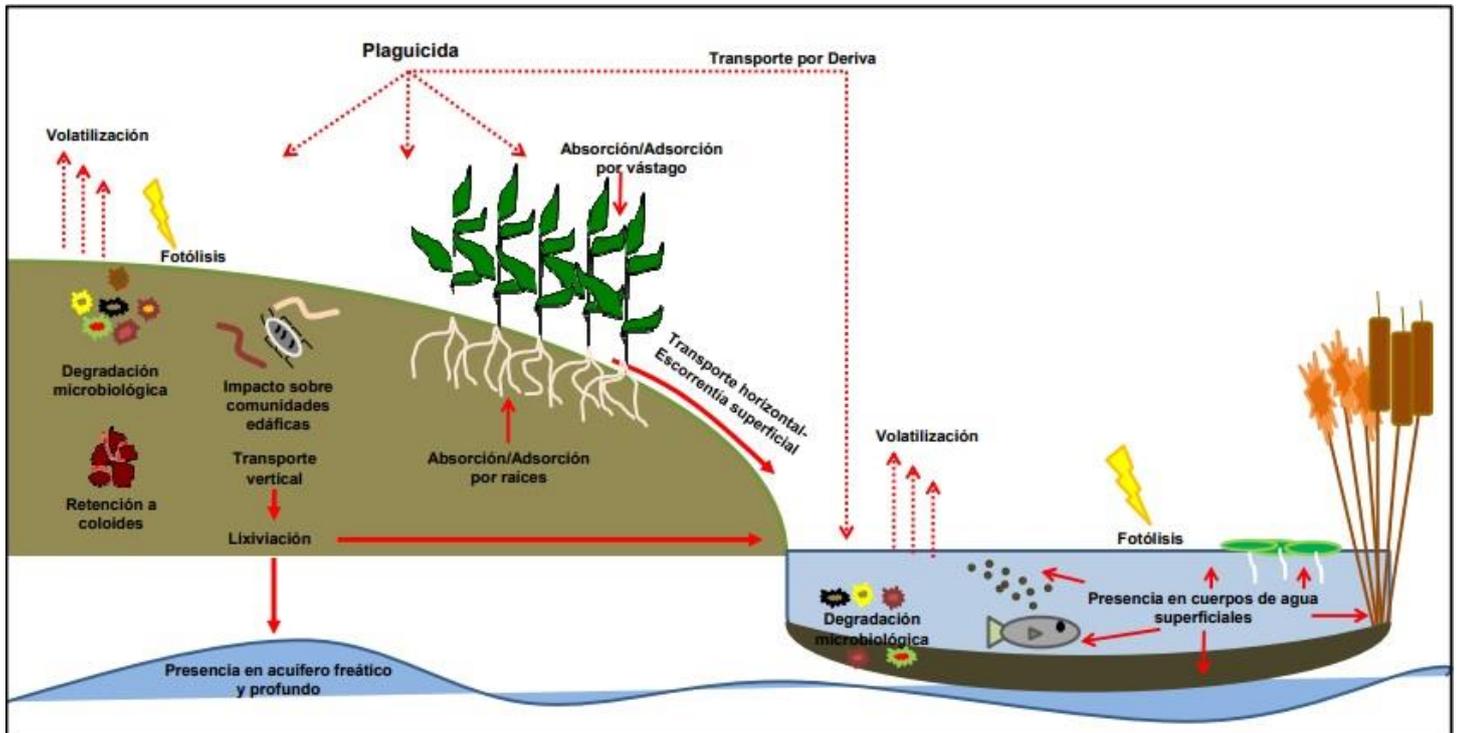


Figura 4. Destinos de los plaguicidas en el medio ambiente (INTA, 2015)

I-4.4.2. Degradación

El GP es degradado a AMPA por múltiples microorganismos del suelo, a través de diferentes mecanismos. Se han descrito en bacterias dos vías metabólicas principales. En la vía dependiente de la actividad de la enzima GP óxido-reductasa, AMPA y glioxilato son los productos finales. La segunda vía involucra la actividad de la enzima carbono-fósforo liasa que cataliza la escisión de la molécula de GP en el enlace carbono-fósforo dando como productos de reacción fosfato inorgánico y sarcosina (**Figura 5**). Algunos de los microorganismos que poseen estas enzimas capaces de metabolizar al GP han permitido la identificación de los genes codificantes para las mismas, los cuales son actualmente utilizados en la producción de cultivos transgénicos (Pollegioni y col., 2011).

Estos procesos se realizan tanto bajo condiciones aerobias como anaerobias. Si bien el AMPA es también degradado en suelo, su degradación es, generalmente, más lenta que la del GP debido a que su adsorción a partículas de suelo posiblemente es más fuerte que con el GP y/o por la menor posibilidad de penetrar las paredes celulares o las membranas de los microorganismos del suelo (Sorensen y col., 2006; Zabaloy y col., 2012).

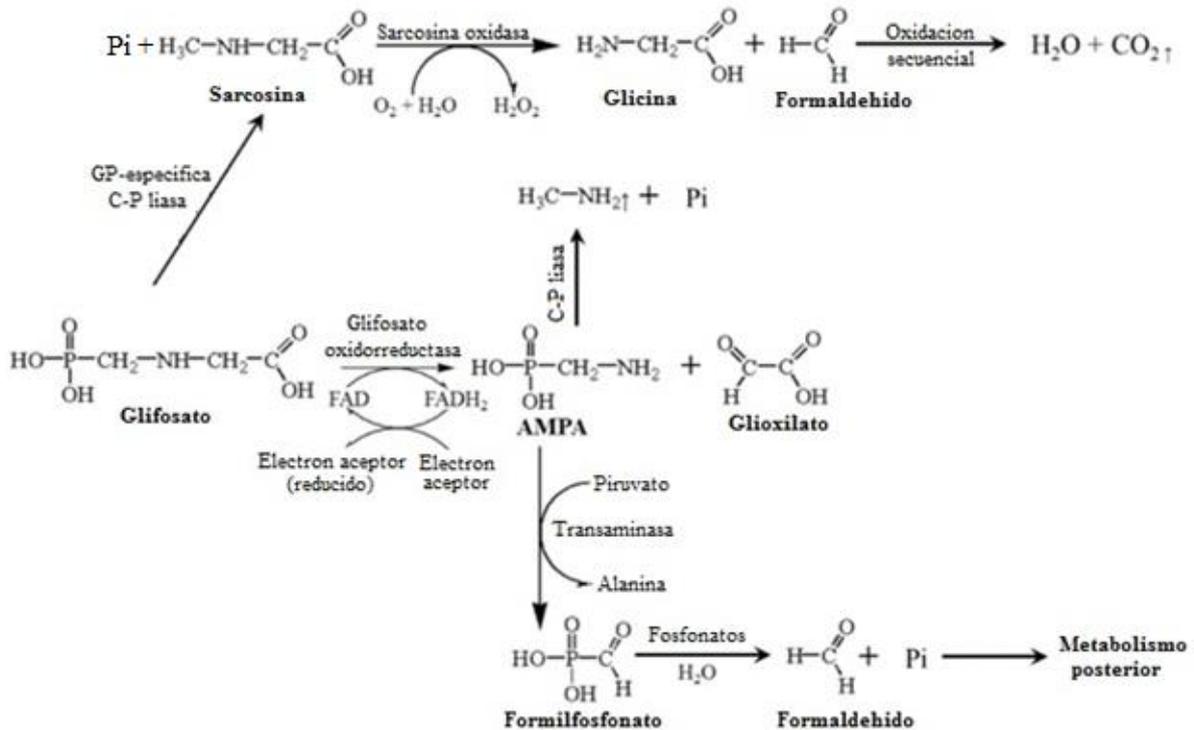


Figura 5. Vías de degradación del glifosato (Huang y col., 2016).

I-4.4.2.1. Biodegradación por la microbiota nativa de suelos agrícolas

Existen especies mejores adaptadas a la utilización del herbicida para su crecimiento, condicionando su prevalencia respecto de otras. Los hongos dominantes aislados en suelos agrícolas expuestos a plaguicidas y su vegetación, pertenecen a las especies de los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Aspergillus*, entre otros (Nesci y Etcheverry, 2002; Pitt y Hocking, 2009; Carranza y col., 2016).

El GP puede conducir a la disrupción de procesos energéticos, biosíntesis o división mitótica de los hongos, pudiendo causar una inhibición reversible de su actividad o una alteración irreversible de las funciones energéticas de la célula o destrucción de la estructura celular. El micelio es la parte más sensible a la acción de los compuestos químicos, por otro lado, las esporas y las clamidosporas son más resistentes debido a su bajo contenido de agua y su alto contenido en ácidos grasos insaturados (Krzysko-Lupicka y Sudol, 2008).

Diferentes investigadores han observado que el GP residual presente en el suelo estimula la respiración microbiana y afecta los procesos de ciclación de nutrientes, funcionando como una fuente de fósforo para el crecimiento de hongos, como también una fuente de carbono y nitrógeno fácilmente disponible cuando se degrada en el suelo (Busse y col., 2001; Ratcliff y col., 2006). Araújo y col. (2003) observaron que con la aplicación de GP se obtienen mayores

recuentos de hongos. El GP puede influir directamente en el número de hongos e indirectamente, afectando su interacción con otros microorganismos, indicando que podrían utilizar el GP como fuente de nutrientes y energía. Otros estudios muestran que la adición de este componente puede inhibir el crecimiento de hongos micorrízicos y como consecuencia, puede estimular el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Fusarium* sp. en ciertos cultivos (Krzysko-Lupicka y Sudol, 2008; Fernández y col., 2009). Krzysko-Lupicka y Orlik (1997) informaron que el GP disminuye el número total de cepas aisladas del suelo y favorece el crecimiento de un número limitado de especies fúngicas cuando se utiliza como única fuente de fósforo o de carbono. Según la capacidad que posean las cepas fúngicas de utilizar el herbicida como fuente de energía o nutriente condicionará su desarrollo y persistencia sobre la microbiota acompañante del suelo. Además se ha informado que las respuestas de las especies fúngicas individuales pueden variar dependiendo de su susceptibilidad al herbicida. Por ejemplo, algunas expresan formas GP-sensibles de la EPSPS (Anderson y Kolmer, 2005; Feng y col., 2005), inhibiendo su desarrollo; y otras son capaces de metabolizar el herbicida mostrando un amplio crecimiento (Hanson y Fernández, 2003; Ratcliff y col., 2006). En hongos, se ha propuesto que las especies GP-tolerantes pueden metabolizarlo, también como un análogo de aminoácidos, si son capaces de utilizar las estructuras de fosfato o amina disponibles (Powell y Swanton, 2008).

I-5. Género *Aspergillus*

I-5.1. Generalidades

Las especies de *Aspergillus*, se consideran entre los organismos de más amplia distribución cosmopolita, capaces de colonizar una gran variedad de sustratos en los diferentes nichos ecológicos del suelo; en general, son frecuentes en climas tropicales y subtropicales pero disminuyen en los climas fríos, mientras algunas especies son restringidas a hábitats específicos. Se consideran contaminantes comunes de varios sustratos, en especial alimentos, granos, suelos (salinos, cultivados, desérticos y de pastoreo), bosques subtropicales deciduos y ambientes internos, entre otros (CAST, 2003; Pitt y Hocking, 2009). Es uno de los géneros fúngicos con mayor importancia económica en la biotecnología (enzimas, ácidos orgánicos, metabolitos bioactivos), pero los miembros del género también son frecuentemente informados como contaminantes transmitidos por los alimentos (descomposición de alimentos y contaminación por micotoxinas), o como agentes causales de micosis en humanos (aspergilosis pulmonar, otomicosis y queratitis) (Houbraken y Samson, 2011; Pitt y Taylor, 2014).

Algunas especies del género se informaron como productoras de enzimas de gran importancia industrial, entre las que se pueden destacar, invertasas (en la elaboración de confites y edulcorantes artificiales), fitasas, celulasas y proteasas (utilizadas para la degradación de compuestos complejos para su uso en alimentos) muy utilizadas en la industria alimenticia (Costa y col., 2010; Veana y col., 2011). Otros estudios evaluaron el rol de *Aspergillus niger* como importante productor de ácido cítrico, utilizado industrialmente como conservante y antioxidante natural (Niu y col., 2015; Li y col., 2016). Las investigaciones de los últimos años muestran el rol de las diferentes especies de *Aspergillus* en la industria y biotecnología, con creciente desarrollo en su uso (Torres y Osorio, 2012).

I-5.2. Taxonomía e identificación del género *Aspergillus*

Según recopilaciones bibliográficas recientes, el género *Aspergillus* se encuentra dividido en 4 subgéneros, cada uno con una o más secciones, y se consideran más de 300 especies (Peterson, 2008; Peterson y col., 2008; Varga y col., 2010; Houbraken y Samson, 2011; Hubka y col., 2014; Houbraken y col., 2014) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Clasificación del género *Aspergillus* (Houbraken y col., 2014)

Subgénero	Sección
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Restricti</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i> <i>Cervini</i> <i>Clavati</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i> <i>Bispori</i> <i>Usti</i> <i>Sparci</i> <i>Silvati</i> <i>Ochraceorosei</i> <i>Acni</i> <i>Cremeri</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Terrei</i> <i>Flavi</i> <i>Nigri</i> <i>Circumdati</i> <i>Candidi</i> <i>Flavipedes</i>

Aspergillus es un género filamentoso, saprófito, perteneciente al filo Ascomycota. Su micelio está formado por hifas hialinas, septadas y puede tener reproducción sexual, con formación de ascos dentro de ascosporas, y asexual, caracterizada por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios. El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular, posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, las que habitualmente se denominan fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides, se encuentran otro tipo de células que reciben el nombre de métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan tanto fiálides como métulas toman el nombre de biseriadas (**Figura 6**) (Abarca, 2000).

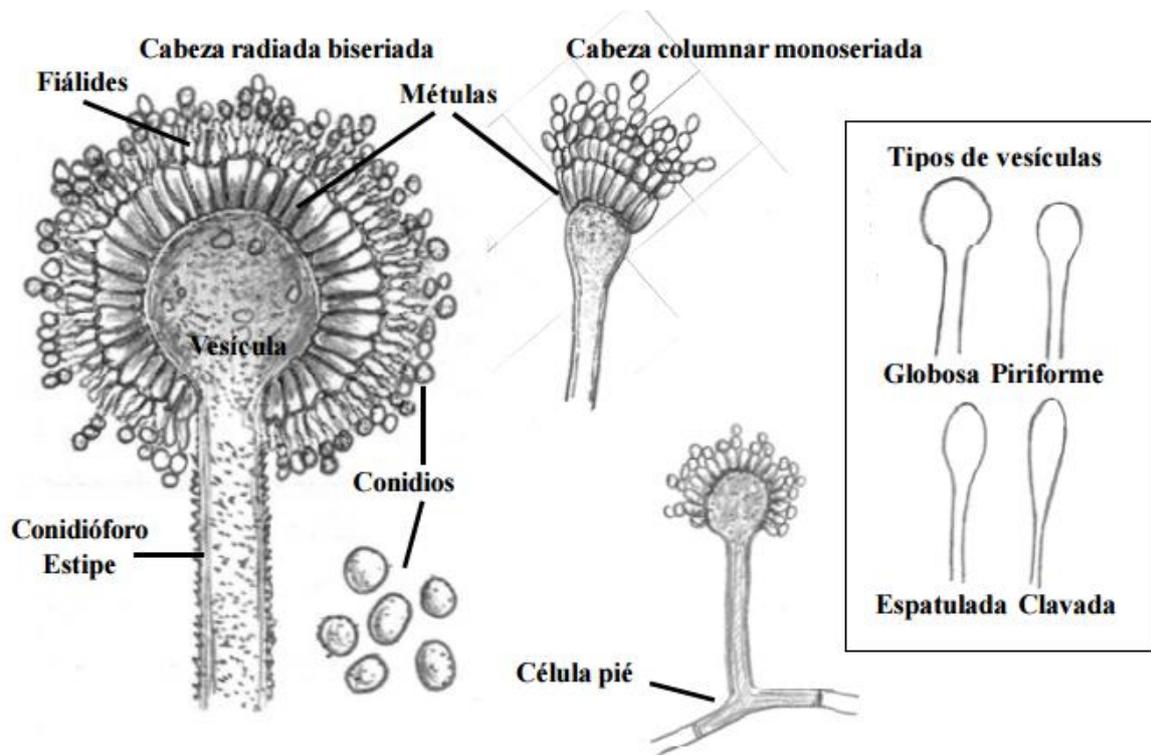


Figura 6. Características morfológicas consideradas para la clasificación de las especies del género *Aspergillus* (Abarca, 2000).

La taxonomía tradicional del género se basa principalmente en sus caracteres fenotípicos y fisiológicos, los cuales han aportado satisfactorias delimitaciones de las especies, sin embargo, existen variaciones morfológicas en varias secciones que han llevado a controversias en sus esquemas taxonómicos. *Aspergillus* y sus teleomorfos han sido investigados con métodos polifásicos (morfológicos, fisiológicos y moleculares) para examinar la variabilidad entre sus especies (Samson y Pitt, 2000; Samson y col., 2006; 2014; Samson y Varga, 2007). Las especies de *Aspergillus* se estudian mediante sus características macro y micromorfológicas, junto a caracteres de crecimiento en diferentes medios de cultivo, perfiles de extrólitos (micotoxinas) y técnicas moleculares, tales como; secuencias ITS (ITS1-5.8S-ITS2), gen de calmodulina, β -tubulina y segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB2) (Geiser, 2004; Balajee y col., 2005; Pringle y col., 2005; Varga y col., 2007; Samson y col., 2007; 2014).

I-5.3. *Aspergillus* sección *Flavi*

Las especies pertenecientes al género *Aspergillus*, subgénero *Circumdati* y a la sección *Flavi* se encuentran distribuidas mundialmente y son comúnmente aisladas a partir de suelos agrícolas (Saito y col., 1986; Klich 2002; Horn 2003; Nesci y col., 2006; Carranza y col., 2016).

El maní, el maíz y la soja son ecosistemas de cultivos que a menudo son invadidos antes de la cosecha por estas especies de *Aspergillus* tanto en regiones tropicales como subtropicales (Klich 2002; Horn 2003). Se caracterizan por la ausencia de estructuras de reproducción sexual y por presentar cabezas aspergiliares en tonos verdosos o amarillentos y esclerocios oscuros a la madurez. Las especies más reconocidas son: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii*, *A. caelatus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. oryzae* y *A. sojae*, entre otras (Peterson, 2000; Samson y col., 2010).

Muchas de las especies son productoras de aflatoxinas (AFs), potentes carcinógenos naturales de preocupación en la inocuidad de los alimentos, y de ácido ciclopiazónico (ACP), que es tóxico para una variedad de animales y ha sido implicado en intoxicación humana (King y col., 2011). Sin embargo, las especies atoxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* se han propuesto como agentes de control biológico, con el fin de prevenir la contaminación por AFs a través de la exclusión de las cepas toxicogénicas durante la infección (Pitt y Hocking 2006; Dorner 2010; Alaniz-Zanon y col., 2013). Además, estas especies atoxicogénicas se evaluaron como posibles agentes de biorremediación, por ejemplo, en procesos de degradación de GP acumulado en suelos agrícolas; mostrando la capacidad de éstas cepas de tolerar diferentes concentraciones de GP incluso bajo condiciones de estrés osmótico (Carranza y col., 2014; 2016). Se observó también que la fase de latencia y la tasa de crecimiento micelial de cepas de ésta sección están significativamente influenciadas por la concentración de GP, a_w y sus interacciones. Resultados similares se informaron por Barberis y col. (2013) con cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* toxigénicas. Estas cepas mostraron el mismo patrón de comportamiento en las diferentes condiciones ensayadas, la fase de latencia disminuyó a medida que aumentó la concentración de GP. Además se observó que el herbicida influye significativamente en la velocidad de crecimiento. En condiciones óptimas de a_w , se observó un aumento significativo en la velocidad de crecimiento con respecto al control en todas las cepas ensayadas (Barberis y col., 2013; Carranza y col., 2014; 2016).

Además de la tolerancia al herbicida, varios trabajos informan el uso de GP como fuente de carbono, fósforo o nitrógeno por estas especies de *Aspergillus* (Duke y col., 2012; Barberis y col., 2013; Carranza y col., 2014, 2016). En un trabajo reciente (Carranza y col., 2017) se evaluó el crecimiento de cepas de *A. oryzae* en medios sintéticos suplementados con GP como fuente de carbono, fósforo y nitrógeno. Las cepas mostraron una velocidad de crecimiento significativamente mayor al control en medios suplementados con GP como única fuente de nitrógeno. Mientras que en los medios con GP como única fuente de carbono o fósforo la velocidad de crecimiento de las cepas fue similar o más elevada respecto al control.

I-5.4. *Aspergillus oryzae* AM₁

Aspergillus oryzae es una de las especies reconocidas dentro de la sección *Flavi*, con capacidad de degradar el herbicida glifosato. Una cepa en particular, denominada en este trabajo como AM₁, no productora de toxinas, es capaz de utilizar el herbicida como fuente de fósforo para su desarrollo. Las principales características de esta cepa aislada de suelo destinado al cultivo de soja y maíz son: color verde seco, con escaso micelio vegetativo, con reverso pálido cuando es aislada en medio agar extracto de malta (MEA); colonias belutinosas, color verde seco, micelio vegetativo central, surcadas, con abundantes esclerocios, reverso pálido, cuando se aísla en agar Czapek extracto de levadura (CYA). Posee también conidios lisos y cabezas uniseriadas.

Considerando la capacidad de ésta cepa de *Aspergillus* sección *Flavi*, aislada de suelo agrícola, de tolerar y utilizar GP en medios de cultivo se plantea la siguiente hipótesis:

II- Hipótesis

La cepa de *Aspergillus oryzae* AM₁ no toxicogénica aislada de suelos destinados al cultivo de soja y maíz tolera y degrada el herbicida glifosato bajo condiciones *in vitro* y en microcosmos.

III- Objetivos

III-1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de la cepa *A. oryzae* AM₁ no toxicogénica nativa de suelos agrícolas de tolerar y degradar diferentes dosis de glifosato usados habitualmente en suelos destinados a cultivos agrícolas.

III-2. Objetivos específicos

- Evaluar *in vitro* la capacidad de degradar diferentes dosis de glifosato por la cepa *A. oryzae* AM₁ no toxicogénica.
- Determinar en ensayos en microcosmos, la evolución de la microbiota nativa a través del tiempo en presencia de diferentes dosis de glifosato.
- Evaluar la tolerancia al glifosato de la cepa *A. oryzae* AM₁ en microcosmos de suelo en presencia de la microbiota nativa.

IV- Materiales

IV-1. Medios de cultivo

-Agar diclorán-rosa de bengala-cloranfenicol (DRBC): peptona 5 g, glucosa 10 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, KH_2PO_4 1 g, solución de diclorán 1 mL, solución de rosa de bengala 1 mL, agar-agar 15 g, solución de cloranfenicol 1 mL, agua destilada pH=7, 1000 mL.

- Agar extracto de malta (MEA): extracto de malta 20 g, peptona 5 g, glucosa 20 g, agar-agar 15 g, agua destilada pH=7, 1000 mL.

-Czapeck doc completo: sacarosa 30 g, NO_3Na 3 g, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, ClK 0,5 g, $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ 1 g, $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, agua destilada pH=7, 1000 mL.

IV-2. Soluciones

-Solución stock de rosa de bengala: 25 mg de rosa de bengala disueltos con 30 mL de etanol al 95% y se llevó a 100 mL con agua destilada.

-Solución stock de cloranfenicol: 250 mg de cloranfenicol disueltos en 100 mL de etanol al 95%.

-Solución stock de diclorán: 200 mg de diclorán se llevaron a 100 mL con etanol.

-Solución de glifosato: se preparó una solución madre de concentración 1 M. Se tomaron 11,32 g de glifosato comercial Roundap Ultramax[®] (cantidad de principio activo: 680 g/Kg) se disolvió y se enrasó con agua destilada en 50 mL. A partir de ella se prepararon las diferentes soluciones de trabajo de 1 mM, 5 mM y 10 mM.

- Solución de 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC) (Sigma Aldrich): se pesó 0,06 g de FMOC se llevó a 10 mL con acetonitrilo.

- Solución de buffer borato de sodio: se mezclaron 25 ml de $\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,025 M y 4,4 mL de NaOH 0,1 N.

- Solución estándar de GP, N-fosfonometilglicina (Sigma Aldrich): se preparó una solución madre de concentración 200 ppm. Se tomaron 10 mg de GP en 50 ml de agua calidad HPLC. A partir de ella se prepararon las diferentes soluciones de trabajo de 1.0, 1.3, 1.5 y 3.0 ppm.
- Solución estándar de ácido aminometilfosfónico (AMPA) (Sigma Aldrich): se preparó una solución madre de concentración 200 ppm. Se tomaron 10 mg de AMPA en 50 mL de agua calidad HPLC. A partir de ella se prepararon las diferentes soluciones de trabajo de 1.0, 1.3, 1.5 y 3.0 ppm.
- Solución de buffer fosfato (KH_2PO_4): se pesaron 0,843 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y se llevaron a 1000 mL con agua calidad HPLC. Se ajustó a pH 2 con ácido ortofosfórico.
- Solución de agua peptonada: peptona 0,1 g en 100 mL de agua destilada.

V- Metodología

V-1. Evaluación de la capacidad de remoción de glifosato *in vitro* por *Aspergillus oryzae* AM₁.

Se utilizó una cepa de *A. oryzae* (AM₁), no productora de AFs y ACP, aislada en un estudio previo de suelo destinado al cultivo de soja y maíz del sur de la provincia de Córdoba (Carranza y col., 2014). Esta cepa fue seleccionada por poseer los mejores parámetros de crecimiento, es decir mayor velocidad de crecimiento y menor longitud de la fase de latencia, en medios de cultivo suplementados con GP. La cepa fue previamente desarrollada en agar extracto de malta (MEA) e incubada durante 7 días a 25°C. Se prepararon Erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de medio Czapeck doc, acondicionado a tres actividades acuosas (a_w) diferentes (0,99; 0,98 y 0,95) mediante la adición de las cantidades correspondientes de glicerol (Marín y col., 1996). Se sustituyó la fuente de fósforo (K_2HPO_4) del medio de cultivo por diferentes concentraciones de una solución de GP para lograr en el medio una concentración final de 1, 5 y 10 mM; además se incluyeron los respectivos controles con la formulación normal del medio, sin el agregado del herbicida. Cada condición se realizó por triplicado.

A partir de un cultivo de la cepa *A. oryzae* (AM₁) en MEA se obtuvieron tacos de micelio de 6 mm de diámetro, con los cuales se inocularon los Erlenmeyers, y se incubaron a 25°C en agitación constante (150 rpm) durante 15 días.

V-1.1. Determinación de la concentración de glifosato residual y la presencia de su principal metabolito de degradación (AMPA) en el medio de cultivo.

Del ensayo anterior se removieron alícuotas de 1 mL de medio de cultivo a las 2 horas (control) y cada 2 días durante los 15 días de incubación. Estos cultivos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 20 minutos. para separar la biomasa fúngica. Se recuperó el sobrenadante para la detección y cuantificación de GP y AMPA. Para lo cual, se realizó la derivatización del GP y del AMPA pre-columna, según el método propuesto Ibañez y col. (2005). La derivatización se llevó a cabo por el agregado de 60 μ L de la solución de buffer borato de sodio (pH 9) y 60 μ L de una solución de 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC). Se dejó reposar por 12 horas y se llevó a pH 2 mediante el agregado de HCl 6N.

Se utilizó para la cuantificación de los analitos un equipo de HPLC de fase reversa con un sistema de detección de fluorescencia (Waters e2695; Waters, Milford, MA, USA). Las separaciones cromatográficas se desarrollaron en una columna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm i.d., tamaño de partícula 5 μ m, Luna-Phenomenex, Torrance, CA) conectada a una

precolumna Security Guard KJO-4282 (20 x 4,6 mm i.d., tamaño de partícula 5 µm, Phenomenex). La velocidad de flujo utilizada fue de 1 mL/minutos y se programó un gradiente con buffer fosfato pH 2 (bomba A) y acetonitrilo (bomba B). El programa comenzó con el solvente A al 70% por 10 minutos y luego se disminuyó al 5% dentro del siguiente minuto y se mantuvo por 3 minutos. Seguido a esto el solvente A fue aumentando al 70% inicial por 1 minutos y se mantuvo hasta el final de la corrida cromatográfica (20 minutos). El tiempo de retención fue de 6,3 minutos para el GP y de 8,4 minutos para el AMPA. El análisis fue realizado a una longitud de onda de excitación de 266 nm y de emisión de 315 nm, el GP y el AMPA fueron cuantificados correlacionando el área del pico de las muestras con el área de los picos de las curvas estándares. El límite de detección del método analítico fue 1 ng/g de muestra para ambos analitos.

La concentración de GP y AMPA (mg/L) se graficó en función del tiempo (días) para calcular el porcentaje de remoción de cada condición ensayada; y en las muestras que se detectó AMPA, la cantidad producida.

La detección y cuantificación de AMPA en el extracto se realizó también por técnicas más sensibles, HPLC MS/MS, en la estación experimental INTA Balcarce a los fines de corroborar la presencia de este metabolito de degradación (Aparicio y col., 2013).

V-2. Evaluación de la tolerancia a glifosato por la cepa *Aspergillus oryzae* (AM₁) en presencia de la microbiota nativa

V-2.1. Preparación de los microcosmos

Se utilizó suelo obtenido de campos del sur de la provincia de Córdoba destinados al cultivo de soja y maíz con historial de exposición a plaguicidas. Los mismos se tamizaron con una malla (tamaño de poro: 2 mm) para eliminar restos vegetales y de piedras; y se esterilizaron en estufa de aire forzado a 180°C por 2 hs. durante 3 días.

Luego se prepararon microcosmos de suelo de 500 g en recipientes plásticos de 1 Kg de capacidad y se acondicionaron con agua estéril a dos porcentajes de humedad (%_H) 30% (estrés hídrico) y 70% (condición óptima) (Bastos, 2008). Previamente se realizó con el mismo suelo una experiencia para calcular la concentración de agua que era necesaria agregar al suelo para lograr los dos porcentajes requeridos en el ensayo.

Se adicionó a cada recipiente plástico de 20 cm de altura y 15 cm de ancho, 500 g de suelo. A cada microcosmo acondicionado previamente se adicionó la cantidad necesaria de GP a fin de obtener una concentración final en los microcosmos de 10, 20 y 50 mg/Kg. A los microcosmos controles se les agregó igual volumen de agua que el de solución de herbicida

correspondiente. Se homogeneizó cuidadosamente el contenido de cada recipiente para permitir que se homogeneizara el herbicida en el suelo.

Las concentraciones empleadas representan niveles 10 veces mayores a los que pueden estar presentes en suelos agrícolas (10 mg/Kg) (Aparicio y col., 2013) y concentraciones que se pueden encontrar en situaciones de derrames del herbicida (20 y 50 mg/Kg).

V-2.2. Inoculación de los microcosmos

Como inóculo se utilizó una solución de esporas de la cepa *A. oryzae* AM₁ desarrollada en MEA durante 7 días a 25°C. La solución se realizó cosechando las esporas de la cepa, desarrollada en MEA, en un frasco conteniendo 800 mL de agua peptonada hasta lograr la concentración de 10⁶ esporas/mL. El recuento de las esporas se realizó en cámara de Neubauer.

Se realizaron 8 tratamientos (suelos sin GP con y sin inocular, suelos con cada una de las concentraciones de GP con y sin inocular). Se incubó en condiciones de invernadero (18-28°C) durante 60 días y se tomaron muestras de cada microcosmo a los 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 días de incubación para evaluar la evolución en el tiempo de la micobiota y la cepa *A. oryzae* AM₁ (**Figura 7**).

V-2.3. Aislamiento, recuento e identificación fúngica

De cada muestra, se realizó el aislamiento y recuento fúngico total mediante el método de diseminación en superficie. Se homogeneizaron 10 g de suelo en 90 mL de solución de agua peptonada y se realizaron diluciones seriadas factor 10 (10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴). Se tomaron alícuotas de 0,1 mL de cada dilución y se sembraron en el medio de recuento general agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC). Las placas se incubaron durante 7 días a 25°C. Aquellas placas conteniendo entre 10 y 100 colonias fueron seleccionadas para realizar el recuento fúngico. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC/g). El recuento fúngico total, de cada género y de la cepa AM₁ inoculada se expresó en log₁₀ UFC/g. La identificación a nivel de género de las diferentes colonias aisladas se realizó mediante la evaluación de caracteres fenotípicos siguiendo los correspondientes esquemas de identificación propuestos por Pitt y Hocking (2009) y Samson y col. (2010).

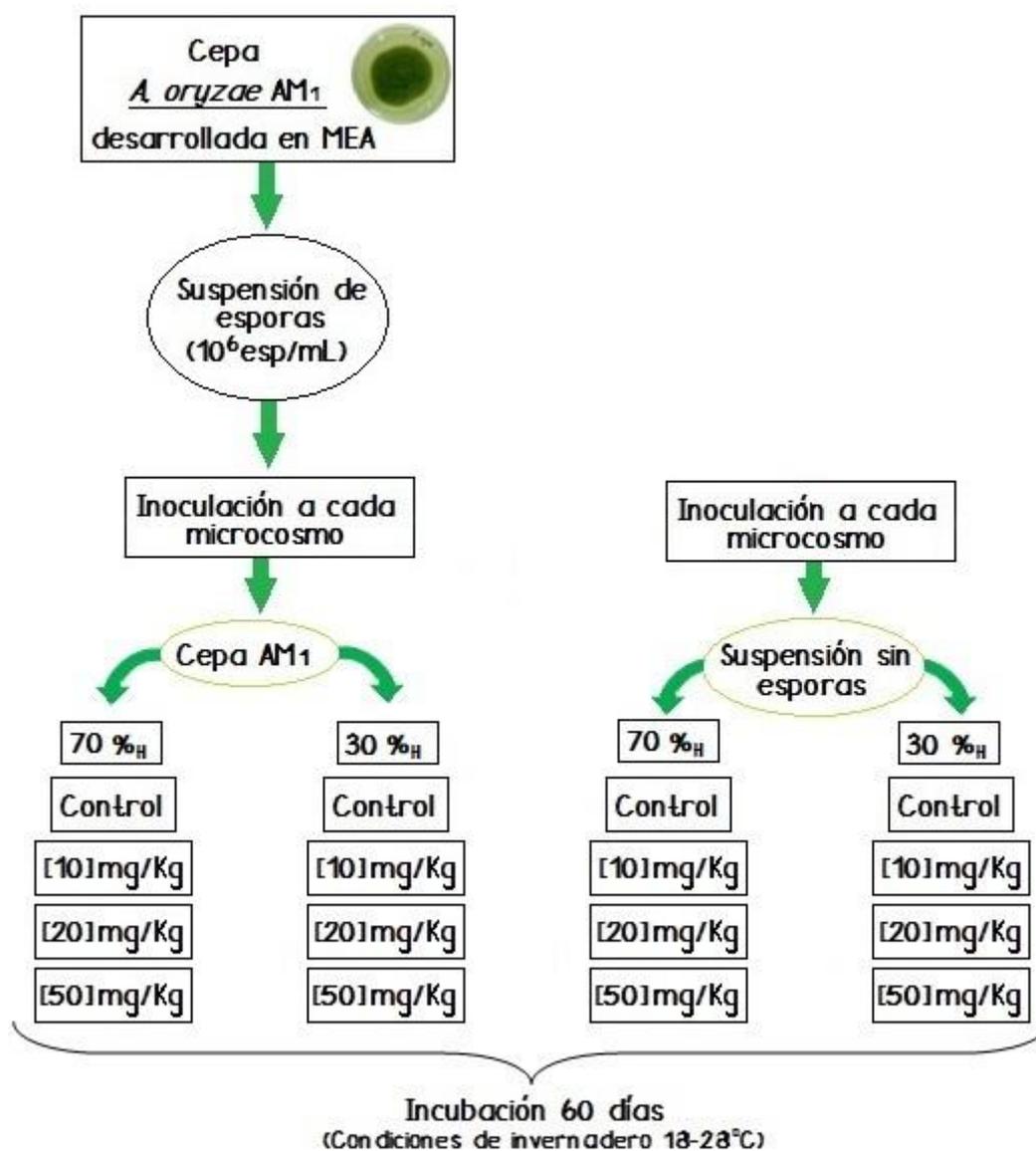


Figura 7: Esquema de acondicionamiento, inoculación e incubación del ensayo *in situ*.
%_H: porcentaje de humedad. mg/Kg: concentraciones de GP adicionadas.

V-3. Análisis estadístico de los datos

Los análisis de los datos se realizaron mediante el análisis de la varianza. Los recuentos de hongos se transformaron usando una función logarítmica $\log_{10}(x)$. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para obtener el efecto de un factor simple (tiempo, %H y concentración de GP), y su doble y triple interacción. La prueba de Fisher (LSD) fue utilizada para determinar las diferencias significativas entre las medias de los recuentos de hongos en los ensayos en microcosmos y los niveles de GP en los ensayos de remoción. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software InfoStat, 2010p de la Universidad Nacional de Córdoba.

VI-Resultados y Discusión

VI-1. Evaluación de la remoción *in vitro* de diferentes dosis de glifosato por la cepa *A. oryzae* AM₁.

En el ensayo *in vitro*, se analizó la capacidad de la cepa AM₁ de remover el GP presente en un medio de cultivo sintético como única fuente de fósforo, acondicionado a diferentes a_w . La condición acuosa del medio no afectó significativamente dicha capacidad ($p > 0,05$). Por lo tanto el análisis estadístico se realizó a las a_w 0,99; 0,98 y 0,95 por separado, a fin de evaluar el efecto de las diferentes dosis del herbicida y el tiempo de incubación en la remoción del GP.

A la a_w 0,99, la remoción de GP varió de acuerdo a la concentración ensayada (**Figura 8**). Con 1 y 5 mM de herbicida, la concentración residual de GP en el medio de cultivo se mantuvo constante durante todo el período de incubación; y no se observó una remoción significativa del mismo. Por el contrario, con 10 mM de GP, durante los primeros días de incubación se registró una leve disminución de la concentración residual del herbicida en el medio de cultivo pero no resultó estadísticamente significativa. Mientras que, a los 12 días de incubación se observó que la cantidad de GP disminuyó significativamente respecto a los días muestreados anteriormente ($p < 0,05$). El porcentaje de remoción alcanzado a los 12 días se estimó en 57%.

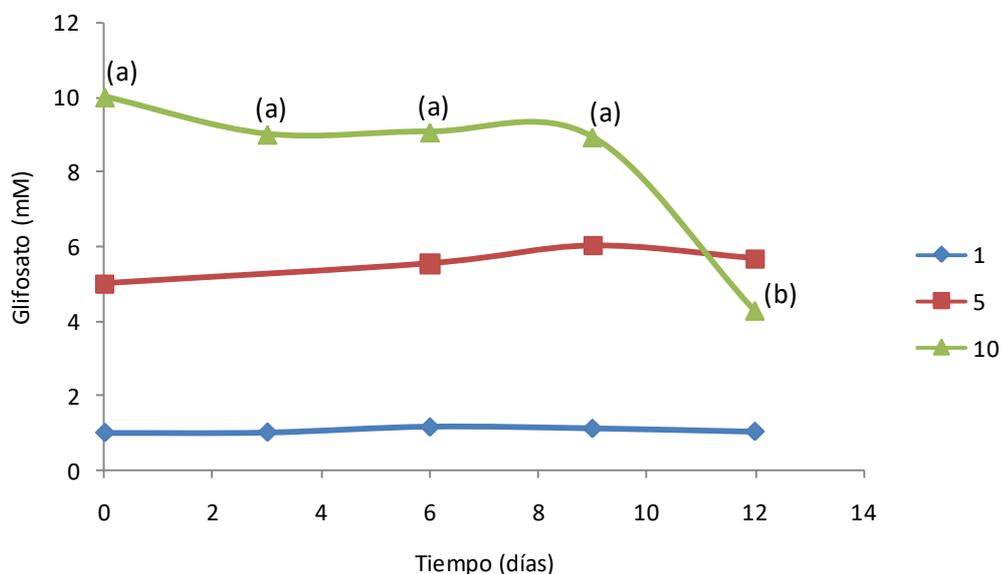


Figura 8. Remoción de GP en medio de cultivo Czapeck doc acondicionado a la a_w 0,99 y con el agregado de diferentes concentraciones de GP (1, 5 y 10 mM) como única fuente de fósforo durante 12 días de incubación. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acuerdo al test LSD.

En la **figura 9** se muestra el desarrollo de la cepa *A. oryzae* AM₁ en medio Czapeck doc con el agregado de 1, 5 y 10 mM de GP como única fuente de fósforo y acondicionado a la a_w 0,99.

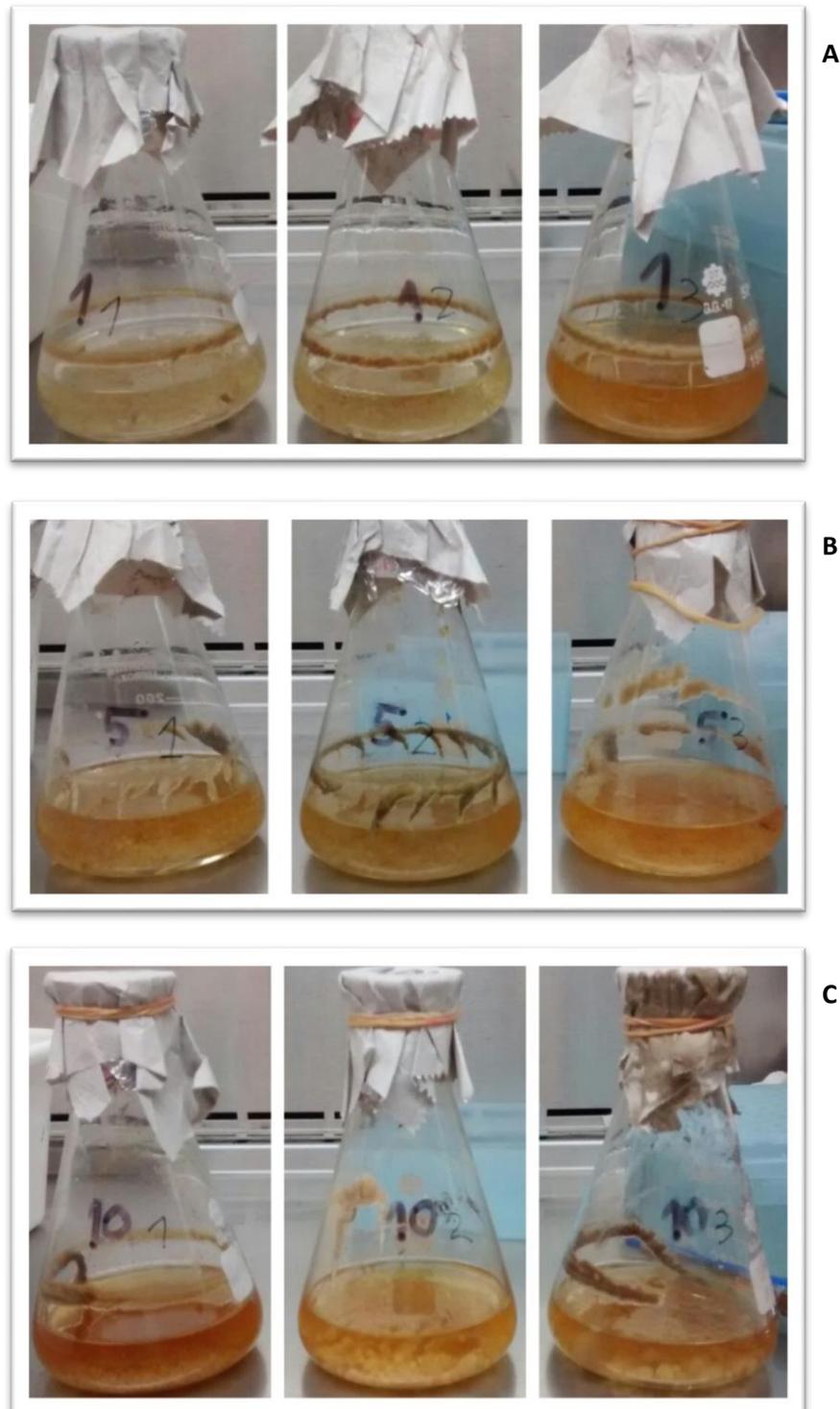


Figura 9. Crecimiento de *A. oryzae* AM₁ en el medio Czapeck doc con 1 (A), 5 (B) y 10 (C) mM de GP a la a_w 0,99 a los 12 días de incubación.

Al analizar los resultados de remoción a la a_w 0,98, se observó que los niveles residuales de GP disminuyeron de acuerdo a la concentración del herbicida incorporado en el medio, mostrando la misma tendencia descrita anteriormente para la mayor a_w ensayada (**Figura 10**). Nuevamente, con 1 y 5 mM de GP, la concentración residual del herbicida en el medio de cultivo se mantuvo constante durante todo el período de incubación. Sin embargo, con 10 mM de GP, a partir de los 12 días de incubación, se observó que la cantidad de herbicida en el medio disminuyó significativamente ($p < 0,05$). El mayor porcentaje de remoción alcanzado (42%) se observó a los 16 días.

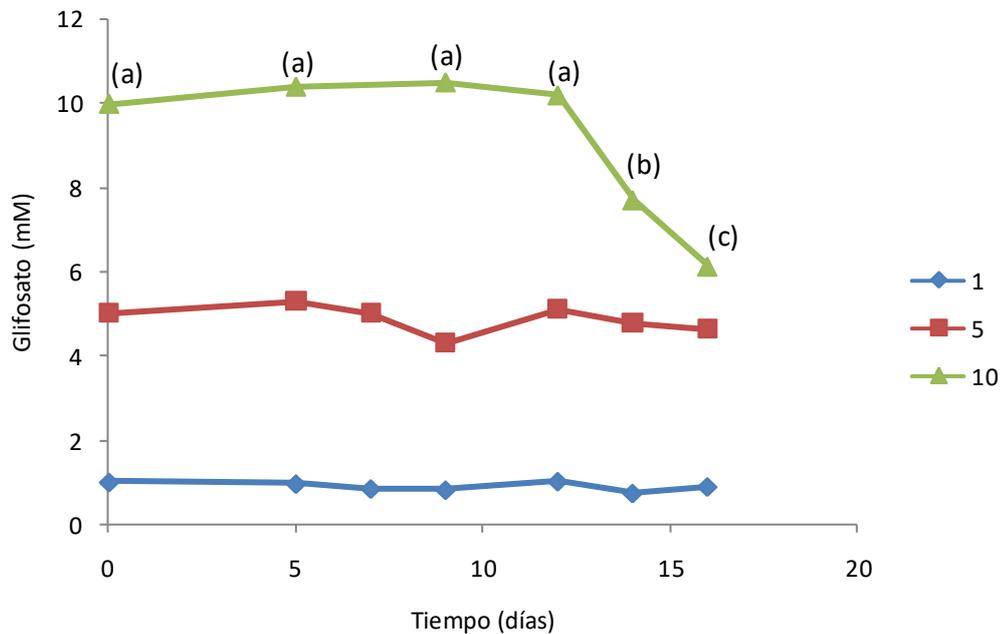


Figura 10. Remoción de GP en medio de cultivo Czapeck doc acondicionado a la a_w 0,98 y con el agregado de diferentes concentraciones de GP (1, 5 y 10 mM) como única fuente de fósforo durante 16 días de incubación. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acuerdo al test LSD.

En la **figura 11** se muestra el desarrollo de la cepa *A. oryzae* AM₁ en medio Czapeck doc con el agregado de 1, 5 y 10 mM de GP como única fuente de fósforo y acondicionado a la a_w 0,98.

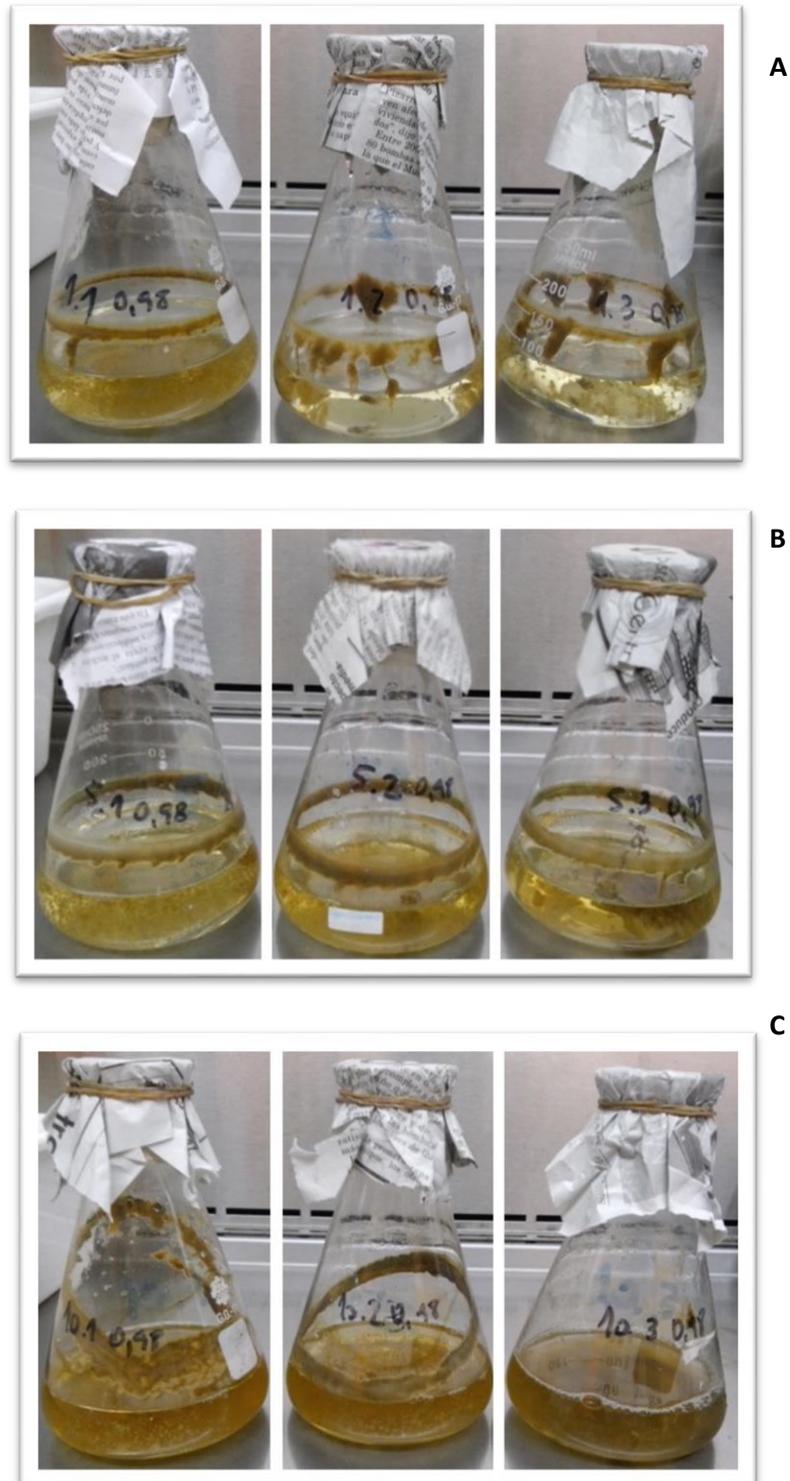


Figura 11. Crecimiento de *A. oryzae* AM₁ en el medio Czapeck doc con 1 (A), 5 (B) y 10 (C) mM de GP a la a_w 0,98, a los 16 días de incubación.

Al analizar los niveles de GP a la a_w 0,95 se observó que, a diferencia de las a_w 0,99 y 0,98, las concentraciones del herbicida no afectaron este parámetro evaluado. La concentración residual de GP se mantuvo constante durante todo el período de incubación a las tres dosis del herbicida ensayadas (1, 5 y 10 mM) (**Figura 12**), por lo tanto, no se observó remoción del mismo durante todo el período de incubación.

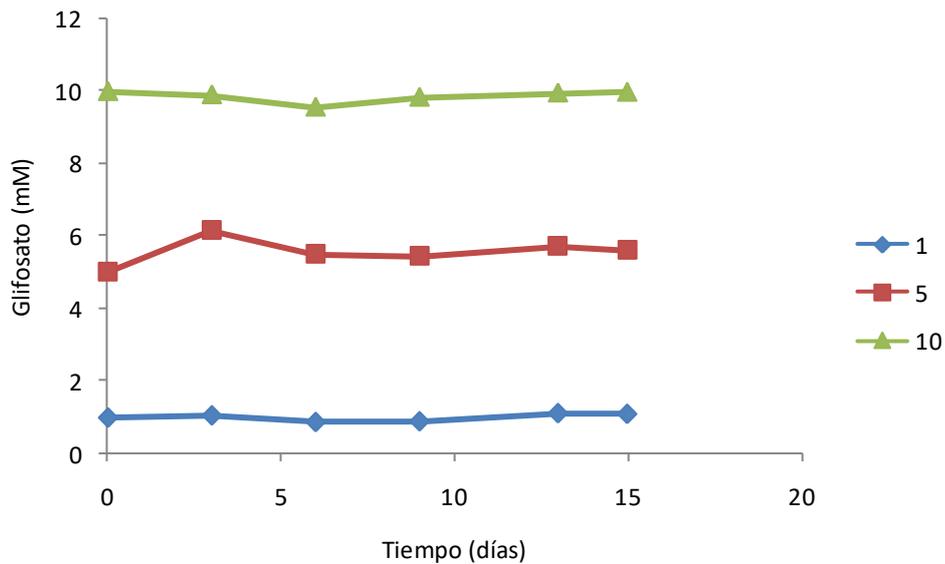


Figura 12. Remoción de GP en medio de cultivo Czapeck doc acondicionados a la a_w 0,95 y con el agregado de diferentes concentraciones de GP (1, 5 y 10 mM) como única fuente de fósforo durante 15 días de incubación.

En la **figura 13** se muestra el desarrollo de la cepa *A. oryzae* AM₁ en medio Czapeck doc y con el agregado de 1, 5 y 10 mM de GP como única fuente de fósforo y acondicionado a la aw 0,95.

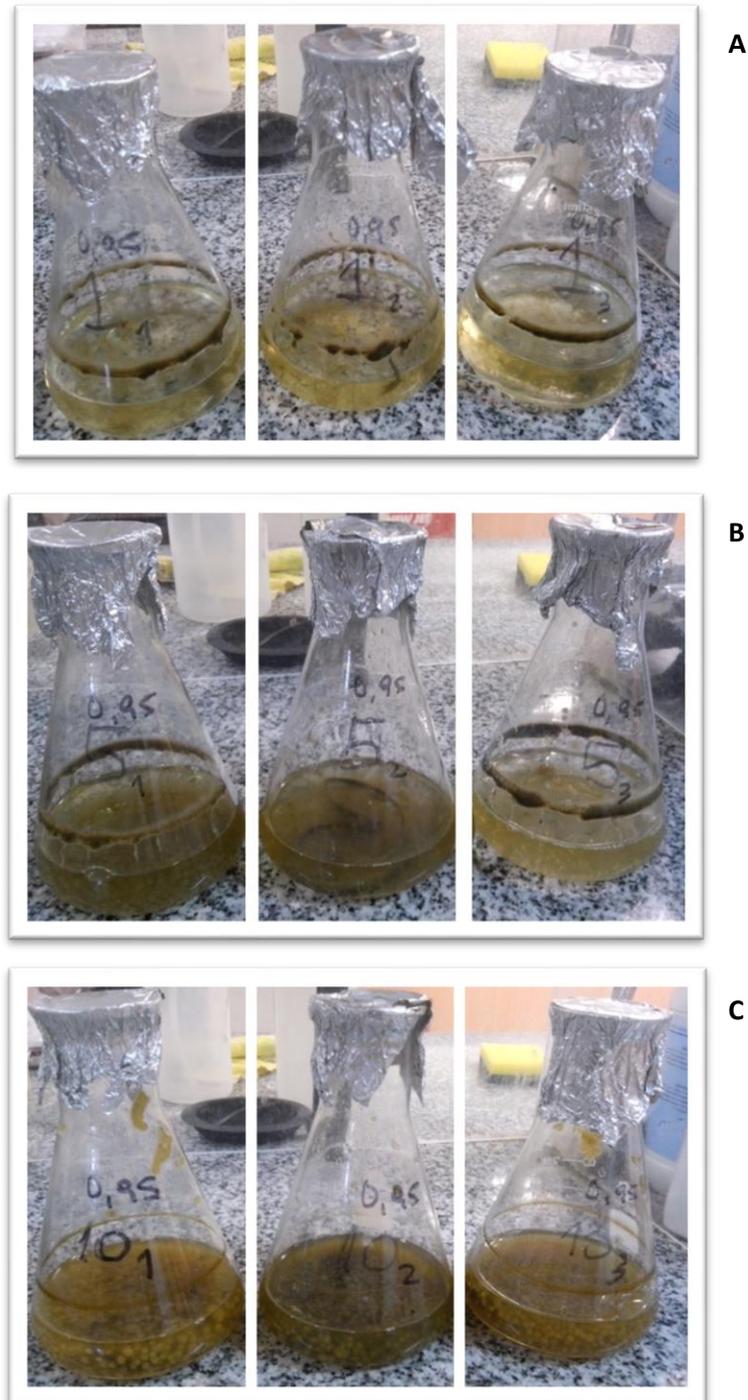


Figura 13. Crecimiento de *A. oryzae* AM₁ en el medio Czapeck doc con 1 (A), 5 (B) y 10 (C) mM de GP a la aw de 0,95, a los 15 días de incubación.

Los resultados de los ensayos de remoción de GP *in vitro* mostraron que la cepa de *A. oryzae* AM₁ fue capaz de remover la concentración de GP más alta ensayada (10 mM) en condiciones de a_w óptimas para el crecimiento (0,99 y 0,98), logrando una remoción de 57 y 42%, respectivamente. En cambio, a la a_w 0,95, no se observó remoción para ninguna de las dosis del herbicida ensayadas. Se pudo observar también que con el agregado de la mayor concentración del herbicida (10 mM), independientemente de la disponibilidad de agua del medio, se obtuvo un mayor desarrollo de la biomasa fúngica. Esto indicaría que esta concentración de GP sería la óptima para ser utilizada como única fuente de fósforo y permitir el mejor desarrollo de la cepa.

Con la metodología ensayada no se logró detectar AMPA en ninguna de las condiciones ensayadas. Los niveles de AMPA registrados por técnicas de HPLC MS/MS variaron entre 0,006 y 0,009 mM a los 15 días de incubación.

Varios trabajos han evaluado el uso de GP como fuente nutricional para el desarrollo microbiano. Kryuchkova y col. (2014), evaluaron el uso de GP como fuente de fósforo, por la cepa *Enterobacter cloacae* K7. Estos investigadores mostraron que la capacidad de degradar el herbicida por la bacteria se debió a la presencia del sistema enzimático liasa C-P, que rompe el enlace C-P para formar componentes no tóxicos, tales como sarcosina y ortofosfato. En ese estudio se ensayaron concentraciones de GP entre 0,5 y 5 mM, observando que el mejor crecimiento se obtuvo con la mayor dosis evaluada. Además, observaron una disminución superior al 50% a los 5 días de incubación, sugiriendo que la concentración de GP en el medio era el factor limitante para el crecimiento de la cepa. En ninguna de las muestras se detectó AMPA, eliminando la posibilidad de degradación de GP mediante la ruptura del enlace C-N; sin embargo, sí pudieron identificar glicina y sarcosina, los cuales son los metabolitos que se forman luego de la degradación del herbicida por medio de la enzima C-P liasa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo, donde en las condiciones óptimas de a_w , se observó que el porcentaje de remoción del herbicida fue similar pero a concentración más elevada (10 mM) y durante más días de incubación.

Otros estudios realizados con diferentes especies fúngicas también mostraron la utilización de GP como un nutriente. Castro y col. (2007), evaluaron la degradación de GP en diferentes tratamientos, entre ellos, su uso como fuente de fósforo, por diferentes cepas de *Fusarium oxysporum* y en asociación con otras cepas fúngicas en consorcios microbianos. Estos autores no encontraron diferencias en la remoción del herbicida por las cepas de *F. oxysporum* o el consorcio microbiano. Además, informaron que la degradación de GP comenzó lentamente al inicio del experimento, probablemente porque el hongo requirió un período de aclimatación para metabolizar el herbicida. Se observó que la degradación se hizo más eficiente después del décimo día, en el que las tasas de reducción por las cepas de

Fusarium alcanzaron hasta el 40% después de 20 días y un aumento de la biomasa durante todo el ensayo. Estos autores no detectaron AMPA en ninguna de las muestras, indicando probablemente la formación de otros metabolitos durante el metabolismo del GP por las cepas evaluadas. Estos resultados concuerdan parcialmente con el presente trabajo, ya que también detectaron remoción de glifosato a altas concentraciones por las cepas estudiadas pero sin detectar AMPA en ninguna de las muestras, ya que en nuestros estudios se detectaron niveles por debajo del límite de cuantificación. Sin embargo, el porcentaje de remoción fue menor al encontrado en este trabajo, a pesar de que el período de incubación fue mayor.

Existe escasa información acerca de la capacidad de degradación de GP por cepas de *A. oryzae*. Wu y col. (2010) aislaron una cepa de *A. oryzae* a partir de lodo de un tanque de aireación de una fábrica de GP. La cepa fue capaz de degradar entre 82 a 86% del herbicida presente en el medio (5 mM); estos porcentajes son superiores a los detectados en el presente trabajo, donde los porcentajes de remoción observados fueron superiores al 50% con el doble de la dosis de GP (10 mM), lo cual enfatiza la capacidad de degradación de la cepa de *A. oryzae* utilizada. En otro estudio posterior, esta cepa de *A. oryzae* fue mutada con luz UV a fin de lograr mayor eficiencia de degradación en fermentación estática y, además, se evaluó la acción de las enzimas necesarias para la degradación del mismo (Fu y col., 2016). Estos investigadores afirman que la concentración de GP juega un papel importante en el crecimiento y la producción enzimática de *A. oryzae*, observando que la producción de biomasa y enzimas aumentó gradualmente con el aumento de la dosis de GP de 3 a 9 mM; mientras que concentraciones superiores a estas tuvieron efectos negativos, con inhibición y muerte del microorganismo debido a la toxicidad del herbicida. Estos autores determinaron que *A. oryzae* pudo crecer y utilizar como fuente de fósforo diferentes dosis de GP, observando tanto un mayor crecimiento como también un aumento de las enzimas necesarias para degradarlo. En el presente trabajo, es evidente que el herbicida fue metabolizado como fuente de fósforo en el medio de cultivo. Además fue evidente el aumento de biomasa fúngica y la remoción del herbicida en el medio de cultivo, con el aumento de la concentración de fósforo desde 1 a 10 mM. En otro estudio más reciente, Fu y col. (2017) analizaron la vía de degradación del herbicida por *A. oryzae*. Estos autores observaron que el GP es degradado a AMPA, el cual luego es transformado a metilamina y finalmente este se degrada a otros compuestos. Además, determinaron que la conversión de GP a AMPA es el paso limitante de la reacción y de él depende la velocidad en la que el GP es posteriormente biodegradado.

Los niveles bajos de AMPA detectados en el presente trabajo, nos lleva a inducir que las vías de degradación que estaría utilizando la cepa serían la vía dependiente de la actividad de la enzima GP óxido-reductasa o aquella que involucra la enzima glicina oxidasa, donde

AMPA y glioxilato son los productos finales. Las vías de degradación que dan AMPA como metabolito intermedio son las principales vías de degradación del herbicida informadas en hongos (Battaglin y col., 2014; Bouchiat y col., 2015).

La no detección de AMPA con la metodología desarrollada en este trabajo se puede atribuir a que el glifosato comercial utilizado en los ensayos *in vitro* posee otros componentes como adyuvantes que pueden enmascarar o atrapar el AMPA impidiendo su detección.

VI-2. Evaluación de la tolerancia a glifosato de la microbiota nativa en ensayos en microcosmos de suelo agrícola

En la **figura 14** se muestra el recuento fúngico total de la microbiota nativa en los diferentes períodos de muestreos aislada de los microcosmos acondicionados a 70 y 30 %_H y con el agregado de distintas concentraciones de GP (10, 20 y 50 mg/Kg).

Al analizar el recuento, se determinó que ninguna de las interacciones entre los tres factores analizados (%_H, GP y tiempo) influyeron significativamente en el recuento de la microbiota nativa ($p > 0,05$). Además, se observó que los factores GP y %_H tampoco tuvieron un efecto significativo. Sin embargo, el factor tiempo por mostró un efecto significativo sobre la variable analizada. Los menores recuentos (4,18 y 4,21 log₁₀ UFC/g) se registraron a los 50 y 60 días de incubación, respectivamente, en comparación al mayor recuento del día 10 (4,67 log₁₀ UFC/g).

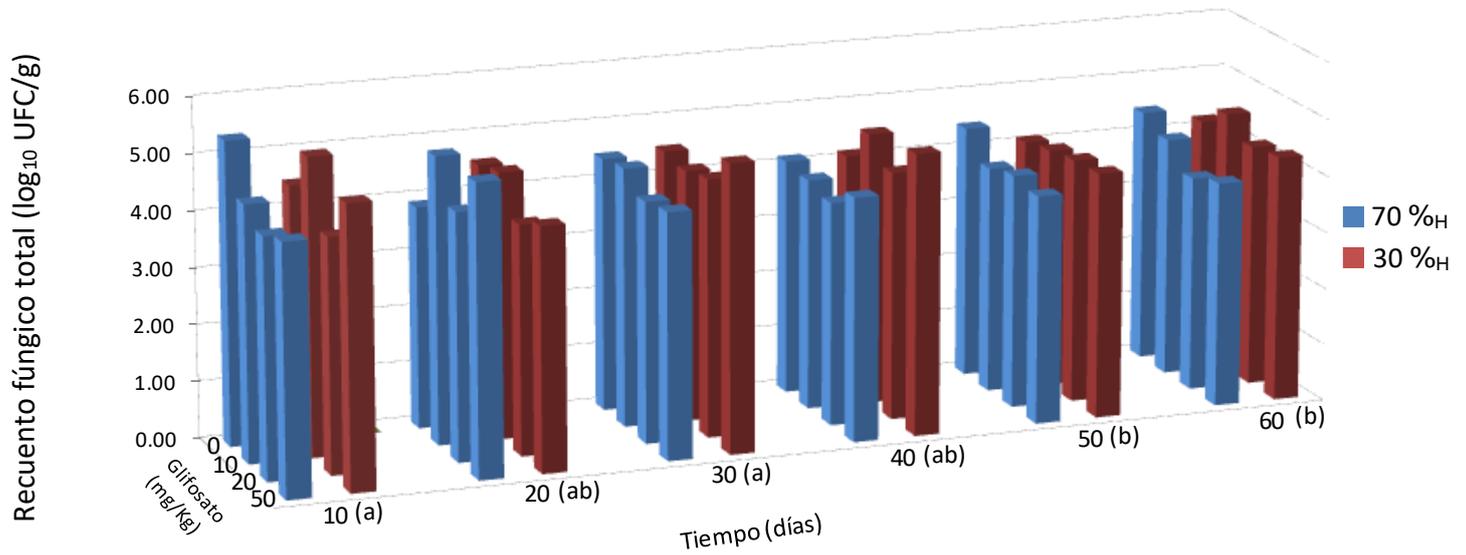


Figura 14. Recuento fúngico total (\log_{10} UFC/g) de la microbiota nativa aislada de suelos acondicionados a 70 y 30 %_H sin (control) y con el agregado de diferentes concentraciones de GP (10, 20 y 50 mg/Kg) en ensayos de microcosmos. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de recuentos de los diferentes tratamientos en cada período de muestreo. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acuerdo al test LSD.

En cada tiempo del muestreo se observó una gran diversidad fúngica. Placas representativas de la microbiota nativa en el medio DRBC presente en los microcosmos a los 10 y 50 días de incubación a ambos %_H se muestran en la **figura 15**.



Figura 15. Placas representativas de la microbiota total aislada en medio DRBC correspondientes a los microcosmos a 30 %_H a los 20 días de incubación con 10 mg/Kg de GP, dilución 10^{-2} (A) y a 70 %_H a los 50 días de incubación con 50 mg/Kg de GP, dilución 10^{-2} (B).

Al analizar la microbiota nativa de los microcosmos, los géneros fúngicos más frecuentemente aislados fueron *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp. y *Trichoderma* sp., tanto a 30 como a 70 %_H. La concentración de GP no influyó significativamente en el recuento de éstos géneros fúngicos ($p > 0,05$) a ambos %_H. Sin embargo el %_H ensayado influyó en el recuento de los géneros más aislados. A 70 %_H, no se observaron diferencias en el recuento de los géneros más frecuentemente aislados. (**Figura 16A**). A 30 %_H, diferente a lo ocurrido anteriormente, los recuentos de *Aspergillus* sp. (3,47 log₁₀ UFC/g) y *Penicillium* sp. (3,11 log₁₀ UFC/g) fueron significativamente superiores al de los géneros *Fusarium* sp. (1,51 log₁₀ UFC/g), *Mucor* sp. (1,31 log₁₀ UFC/g) y *Trichoderma* sp (1,37 log₁₀ UFC/g) a todas las concentraciones de GP (**Figura 16B**).

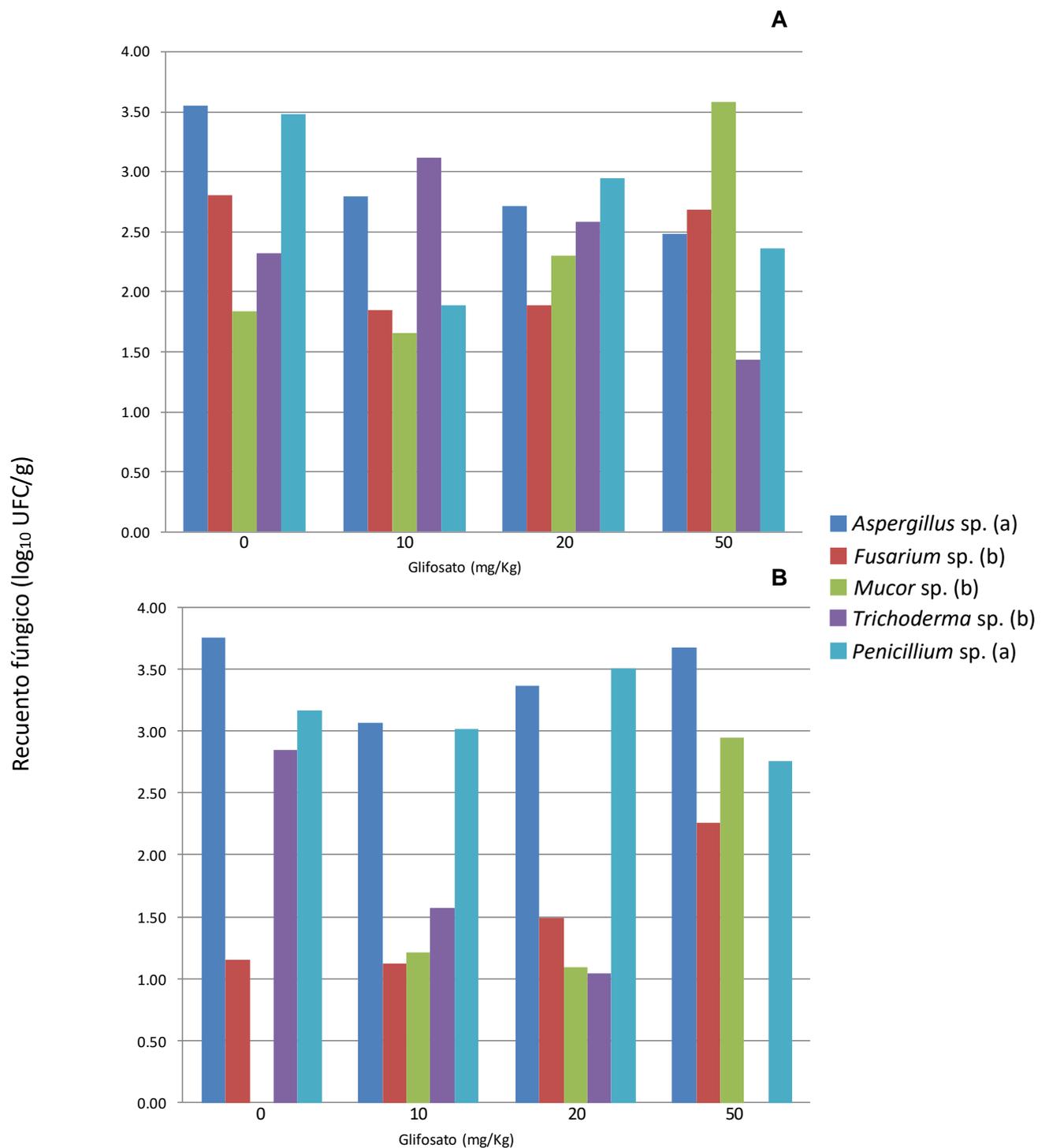


Figura 16. Recuento de los géneros fúngicos más frecuentemente aislados (\log_{10} UFC/g) de suelo acondicionado a 70 y 30 % $_H$ sin (control) y con diferentes concentraciones de GP (10, 20 y 50 mg/Kg) en ensayos de microcosmos. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de recuentos totales bajo los diferentes tratamientos a 30 % $_H$ (**A**) y a 70 % $_H$ (**B**). En la figura B, los valores con letras a y b son significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acuerdo al test LSD.

Al analizar cada género en particular, se observó que el recuento de *Aspergillus* sp. (**Figura 17**) en los diferentes períodos de muestreo (**Figura 18**), nuevamente, cada uno de los factores analizados por sí solos (%H, GP y tiempo) y sus interacciones no influyeron significativamente sobre el recuento ($p > 0,05$). Es decir que el recuento de las especies de *Aspergillus* sp., aisladas de los microcosmos a lo largo del período de incubación, no se vio afectado significativamente por los distintos tratamientos realizados. Los valores medios del recuento oscilaron entre 2,47 y 3,76 \log_{10} UFC/g. Cabe destacar que las especies aisladas de este género durante todo el ensayo, no pertenecieron a la sección *Flavi*.



Figura 17. Imagen representativa del género *Aspergillus* sp. La parte **A** muestra colonias pertenecientes al género aisladas en medio MEA. La parte **B** muestra la observación microscópica del mismo a 40x.

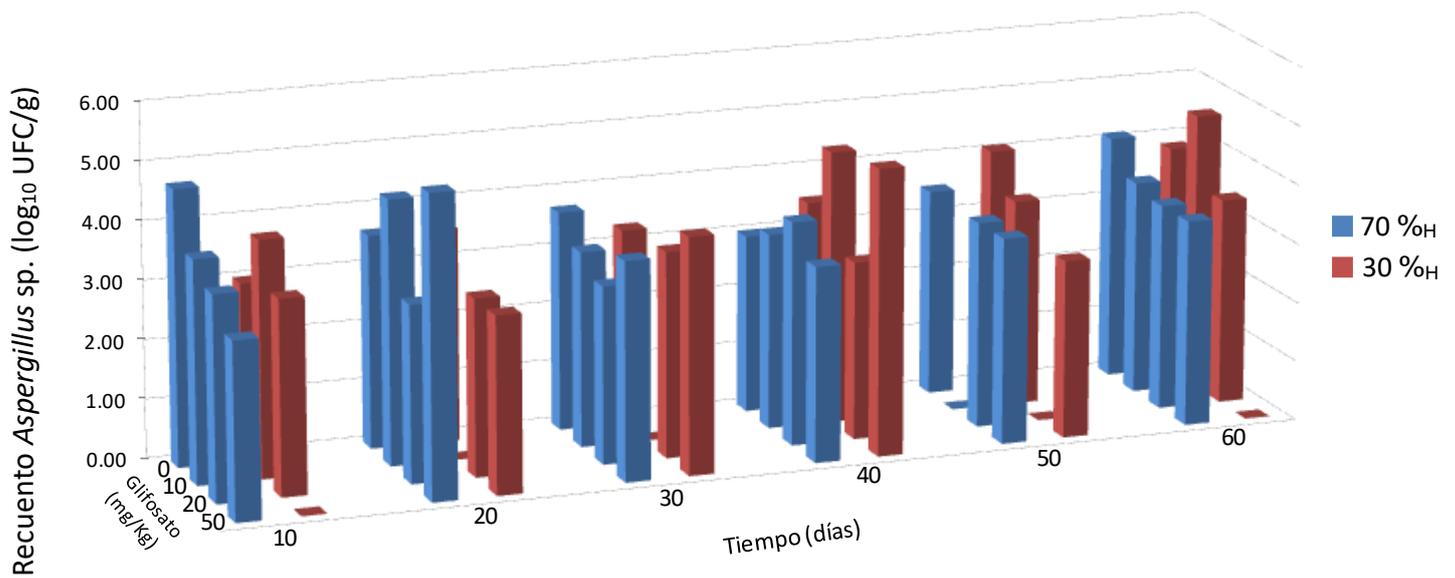


Figura 18. Recuento de *Aspergillus* sp. (\log_{10} UFC/g) de suelos acondicionados a 70 y 30 %_H sin (control) y con diferentes concentraciones de GP (10, 20 y 50 mg/Kg) en ensayos de microcosmos. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de recuentos de los diferentes tratamientos en cada período de muestreo.

Al igual que para el género *Aspergillus* sp., el recuento del género *Fusarium* sp. (**Figura 19**) en los diferentes períodos de muestreo (**Figura 20**), no mostró que cada uno de los factores analizados (%_oH, GP y tiempo) por sí solos y sus interacciones tuvieran efecto significativo en el recuento de las especies de *Fusarium* sp. aisladas ($p > 0,05$). Los valores medios de los recuentos obtenidos para dicho género oscilaron entre 1,13 y 2,80 \log_{10} UFC/g.

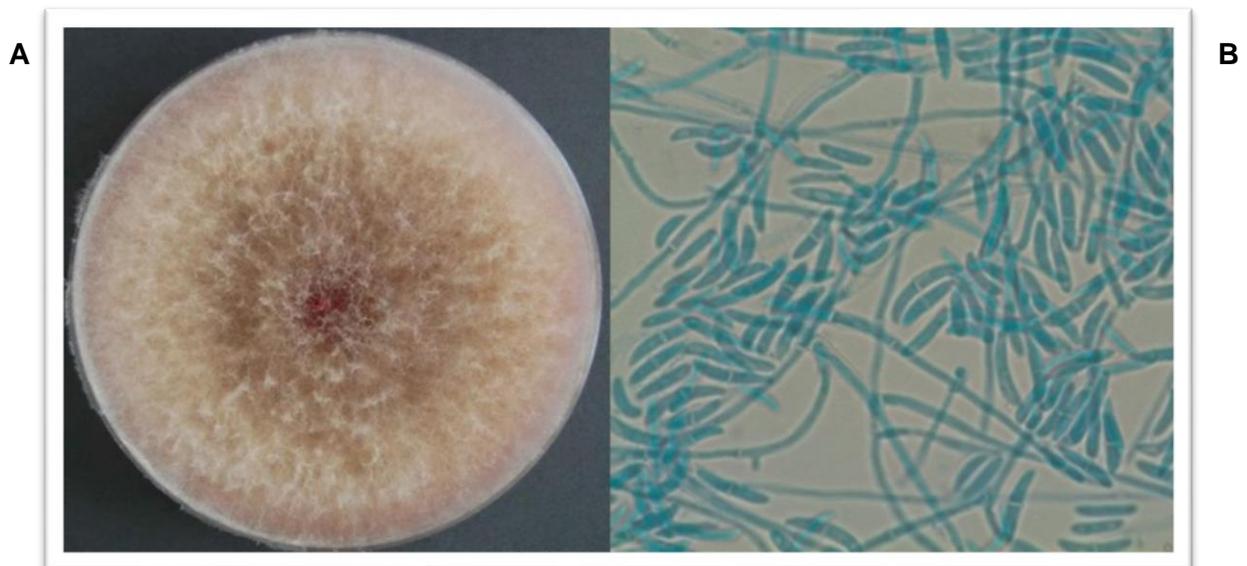


Figura 19. Imagen representativa del género *Fusarium* sp. La parte **A** muestra colonias pertenecientes al género aisladas en medio MEA. La parte **B** muestra la observación microscópica del mismo a 40x.

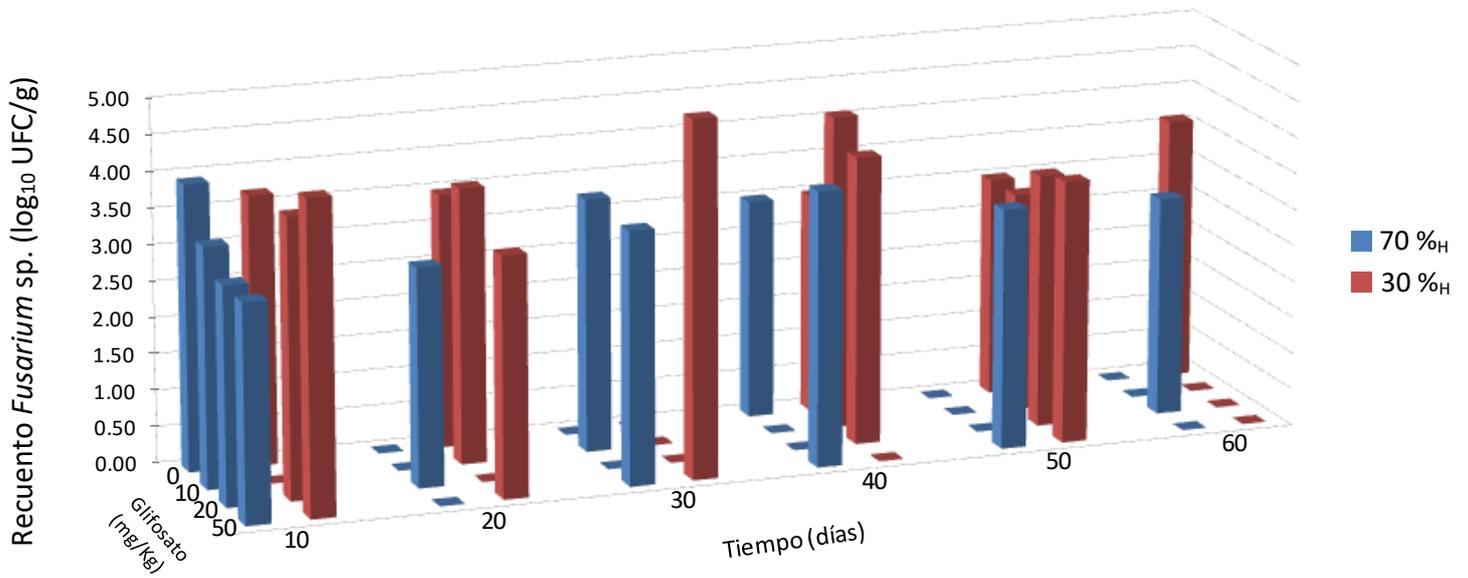


Figura 20. Recuento de *Fusarium* sp. (\log_{10} UFC/g) de suelos acondicionados a 70 y 30 %_H sin (control) y con diferentes concentraciones de GP (10, 20 y 50 mg/Kg) en ensayos de microcosmos. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de recuentos de los diferentes tratamientos en cada período de muestreo.

Los recuentos totales del género *Penicillium* sp. (**Figura 21**) en los diferentes períodos de muestreo (**Figura 22**), mostraron que el mismo no se vio afectado significativamente por los tres factores individuales estudiados (%_{oH}, GP y tiempo) ni por ninguna de sus interacciones ($p > 0,05$). Los valores medios de los recuentos obtenidos para este género fúngico variaron entre 1,88 y 3,51 \log_{10} UFC/g.

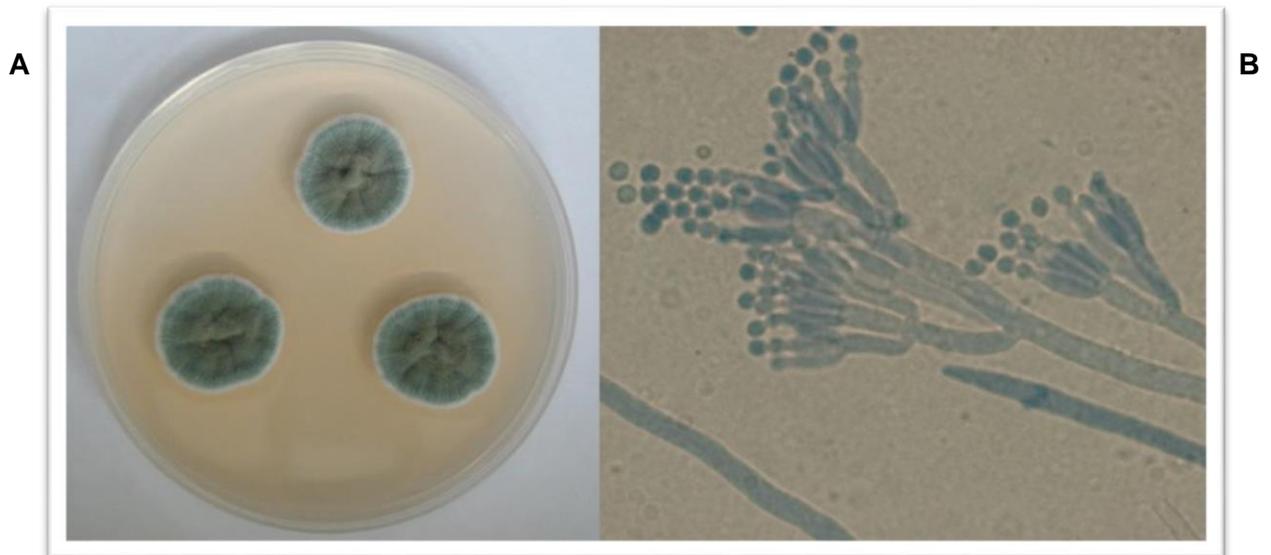


Figura 21. Imagen representativa del género *Penicillium* sp. La parte **A** muestra colonias pertenecientes al género aisladas en medio MEA. La parte **B** muestra la observación microscópica del mismo a 40x.

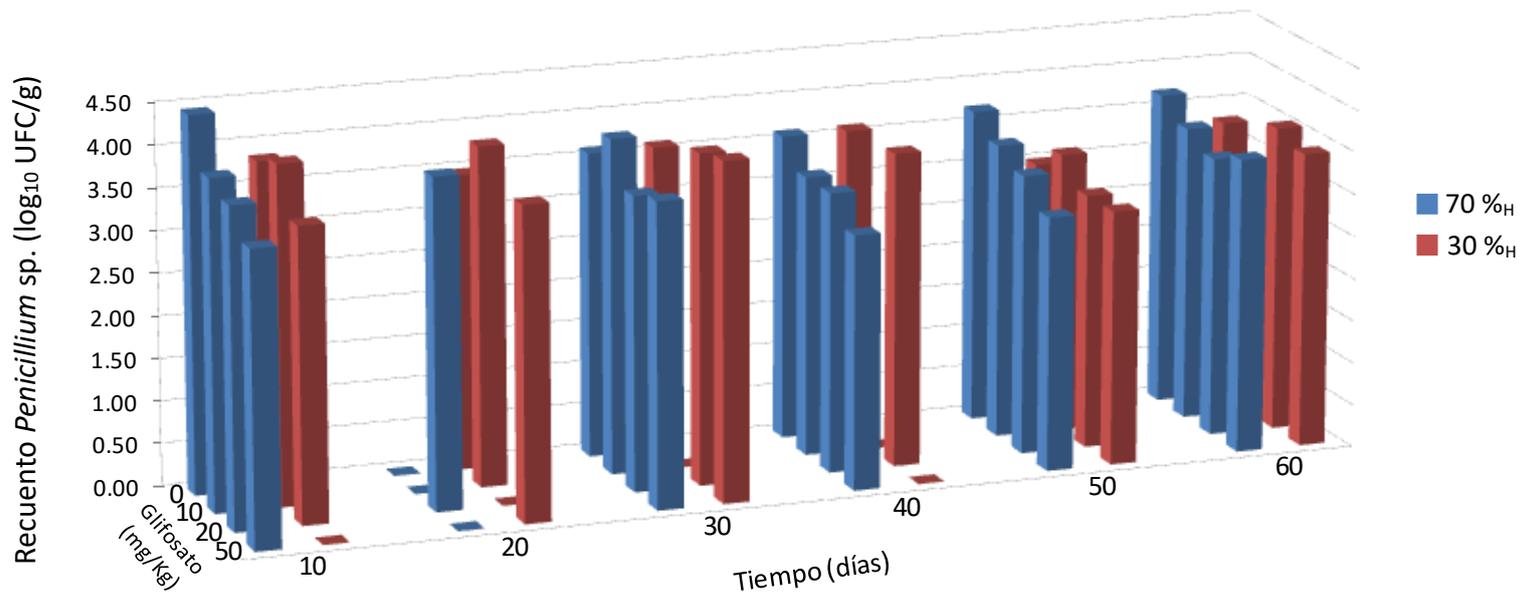


Figura 22. Recuento de *Penicillium* sp. (log₁₀ UFC/g) de suelos acondicionados a 70 y 30 %_H sin (control) y con diferentes concentraciones de GP (10, 20 y 50 mg/Kg) en ensayos de microcosmos. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de recuentos totales de los diferentes tratamientos en cada período de muestreo.

Para el género *Mucor* sp. (**Figura 23**), el recuento en los diferentes períodos de muestreo (**Figura 24**), sólo se vio influenciado por las diferentes concentraciones de GP ($p < 0,05$). Los demás factores estudiados ($\%_{\text{OH}}$ y tiempo) como las interacciones dobles o triples entre todos los factores no tuvieron efecto significativo en el recuento de *Mucor* sp. No se encontraron diferencias significativas entre el recuento observado en las muestras control y en el registrado con 10 y 20 mg/Kg de GP ($1,34 \log_{10}$ UFC/g). Sin embargo con 50 mg/Kg de GP, el recuento de *Mucor* sp. ($3,26 \log_{10}$ UFC/g) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) al recuento observado tanto en el tratamiento control como en los tratamientos con 10 y 20 mg/Kg de GP. Los valores medios de los recuentos para *Mucor* sp. en los microcosmos variaron entre 1,10 y $3,57 \log_{10}$ UFC/g.

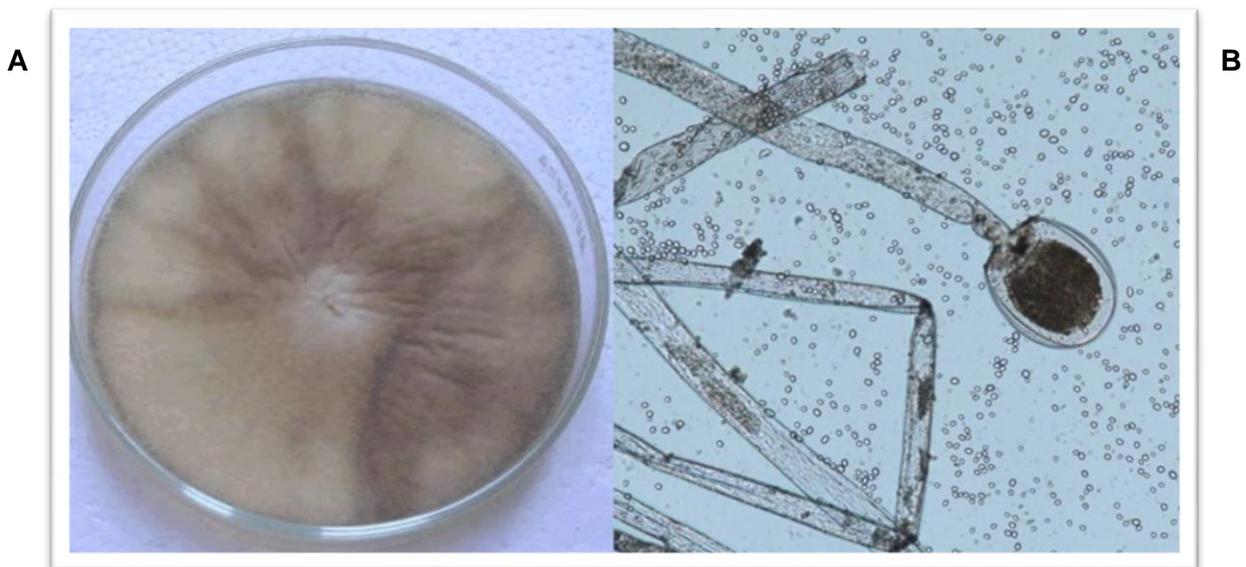


Figura 23. Imagen representativa del género *Mucor* sp. La parte **A** muestra colonias pertenecientes al género aisladas en medio MEA. La parte **B** muestra la observación microscópica del mismo a 40x.

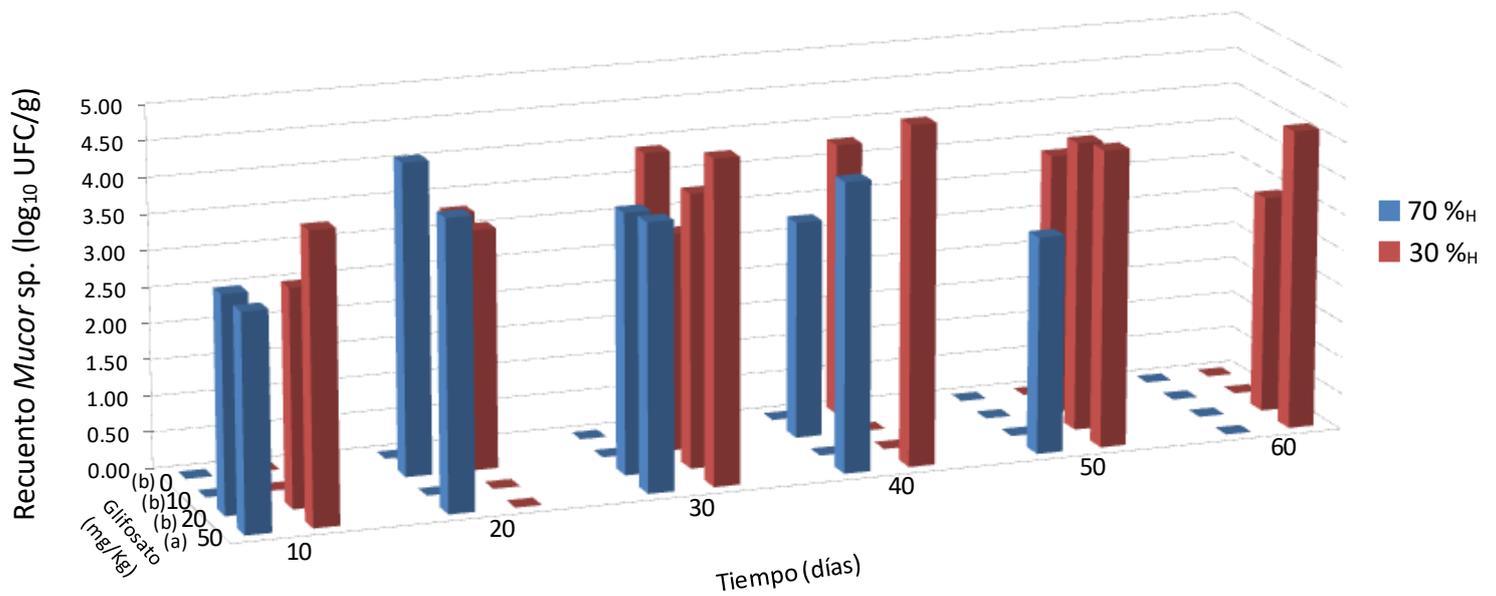


Figura 24. Recuento de *Mucor* sp. (\log_{10} UFC/g) de suelos acondicionados a 70 y 30 %_H sin (control) y con diferentes concentraciones de GP (10, 20 y 50 mg/Kg) en ensayos de microcosmos. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de recuentos totales de los diferentes tratamientos para cada período de muestreo. Los valores a y b indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test LSD.

Al analizar los recuentos del género *Trichoderma* sp. (**Figura 25**) en los diferentes períodos de muestreo (**Figura 26**), se determinó que sólo las distintas concentraciones de GP influyeron significativamente en el recuento de *Trichoderma* sp. ($p > 0,05$). Los demás factores estudiados individuales (%_H y tiempo) ni ninguna de sus interacciones afectaron significativamente el recuento de este género fúngico. Para este último género analizado, los valores medios de los recuentos oscilaron entre 1,05 y 3,11 log₁₀ UFC/g.

Se observó que no hubo diferencias significativas entre el recuento de *Trichoderma* sp. en el tratamiento control y el recuento registrado en los tratamientos con 10 y 20 mg/Kg de GP. A su vez, no se encontraron diferencias significativas en los recuentos observados con 20 y 50 mg/Kg. El valor medio más alto del recuento se obtuvo en la condición control (2,58 log₁₀ UFC/g), mientras que el recuento de este género disminuyó significativamente con la más alta concentración de GP ensayada (50 mg/Kg), obteniendo el menor recuento (0,71 log₁₀ UFC/g).

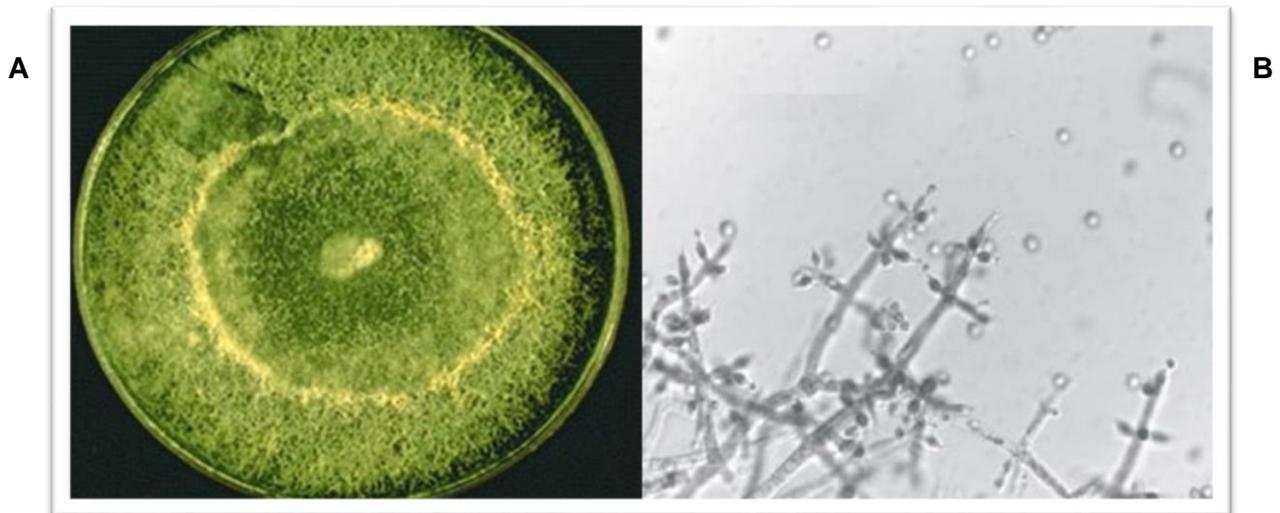


Figura 25. Imagen representativa del género *Trichoderma* sp. La parte **A** muestra colonias pertenecientes al género aislado en medio MEA. La parte **B** muestra la observación microscópica del mismo a 40x.

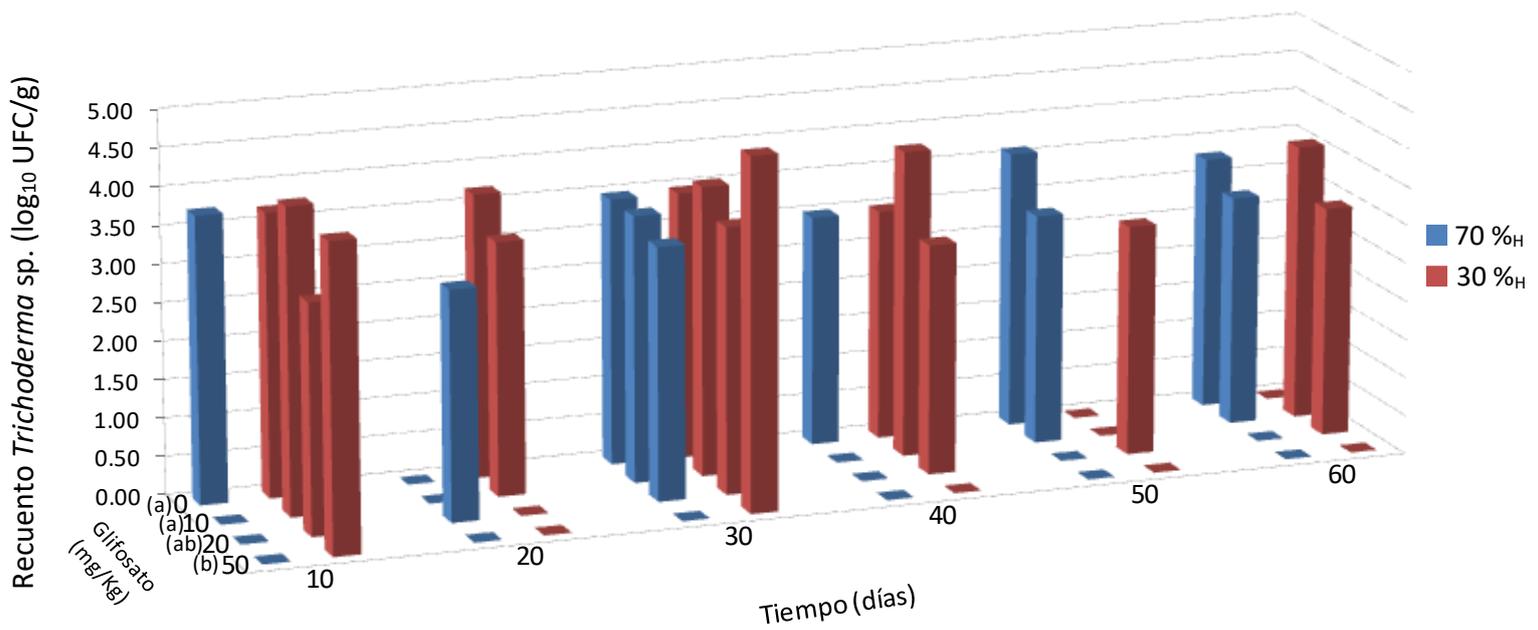


Figura 26. Recuento de *Trichoderma* sp. (log₁₀ UFC/g) de suelos acondicionados a 70 y 30 %_H sin (control) y con diferentes concentraciones de GP (10, 20 y 50 mg/Kg) en ensayos de microcosmos.

El análisis estadístico se realizó comparando los valores de recuento totales bajo los diferentes tratamientos para cada período de muestreo. Los valores a y b indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test LSD.

El análisis de los datos de la micobiota, mostró que los géneros fúngicos aislados con mayor frecuencia a ambas %_H fueron *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp. y *Trichoderma* sp. A 70 %_H, *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. se aislaron en alta frecuencia en todas las concentraciones de GP ensayadas, mientras que a 30 %_H, no se encontraron diferencias significativas en los recuentos de los cinco géneros aislados. Estos resultados coinciden parcialmente con los descriptos en varios trabajos previos donde se realizó el aislamiento fúngico de muestras de suelo agrícola. Nesci y col. (2006), informaron una alta frecuencia de aislamiento de los géneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp., seguidos por *Cladosporium* sp y *Alternaria* sp., en suelos de la región central de Córdoba bajo diferentes prácticas de labranza. Carranza y col. (2014; 2016), además de los géneros mencionados, aislaron especies de *Paecilomyces* sp., *Sterilia* sp., y *Phytium* sp. de suelos con una exposición prolongada de más de 10 años a plaguicidas.

Respecto al recuento fúngico total, se observó que los recuentos variaron significativamente sólo con el tiempo de incubación; los valores más elevados se observaron a los 10 días y los valores más bajos se registraron al final del período de incubación (50 y 60 días). Contrariamente a estos resultados, Sebiomo y col. (2011) encontraron que en muestras de suelo tratadas con GP, la población de hongos aumentó a medida que transcurrieron las semanas, ya que los mayores recuentos se observaron en el último período de muestreo (sexta semana). Zain y col. (2013) observaron que los recuentos fúngicos totales disminuían a medida que aumentaba la concentración de diferentes herbicidas (entre ellos, el GP), lo cual no coincide con los resultados de este trabajo, ya que, las concentraciones de GP probadas no tuvieron influencia en el recuento fúngico total. Carranza y col. (2016) informaron valores de recuento menores en suelos sin exposición a plaguicidas con respecto al recuento observado en los suelos expuestos a plaguicidas, lo cual no coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo donde no se obtuvieron diferencias significativas entre el tratamiento control (sin GP) y los tratamientos con diferentes dosis del herbicida.

Los géneros aislados con mayor frecuencia en los microcosmos, se vieron afectados de manera diferente por los tratamientos con GP. Los recuentos de las especies de los géneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. no se vieron afectados significativamente por las dosis del herbicida ensayadas, ya que, los recuentos fueron similares en las muestras control con respecto a las muestras tratadas con concentraciones crecientes de GP. Las especies de los géneros *Trichoderma* sp. y *Mucor* sp. mostraron un comportamiento diferente al explicado anteriormente. Los valores de los recuentos de *Trichoderma* sp. fueron superiores en la condición control, respecto al observado con la dosis de 50 mg/Kg, donde se registraron los menores recuentos. En cuanto a *Mucor* sp., los mayores recuentos se obtuvieron con la concentración de GP más alta probada, mientras que con las demás dosis y en el tratamiento control los recuentos fueron menores. Zain y col. (2013) observaron que

el crecimiento de *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. fue inhibido cuando se aplicó dos veces la concentración de GP recomendada (20 mM). Estos autores registraron una disminución del aislamiento de estos géneros entre 18 y 58%. A su vez, observaron que *Mucor* sp. fue el género más susceptible a la aplicación del herbicida, ya que el porcentaje de inhibición fue entre 63 y 80%. Contrariamente a lo informado por estos investigadores, en el presente trabajo se observó que tanto el aislamiento de *Aspergillus* sp. como el de *Penicillium* sp. no fue afectado significativamente por ningún tratamiento con GP, incluso a la dosis más alta ensayada en este estudio (50 mM). Las especies de *Mucor* sp. fueron mayormente aisladas con las concentraciones más altas del herbicida, lo cual se opone nuevamente a lo observado por estos autores, ya que dicho género fue el más susceptible al tratamiento con GP. Además, en ese estudio observaron diferencias en el aislamiento de todos los géneros fúngicos aislados en los diferentes períodos de muestreo. En los primeros días de incubación (entre el día 2 y 6) registraron bajas frecuencias de aislamiento y luego ésta fue aumentando a medida que transcurrió el período de incubación (20 días). Mientras que en el presente trabajo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los recuentos fúngicos entre los días de incubación. Meriles y col. (2006), estudiaron la correlación entre el efecto de diferentes concentraciones de GP y el aislamiento de diferentes géneros fúngicos, entre ellos *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp., a diferentes días de incubación. Estos autores no encontraron correlación entre las dosis de herbicida ensayadas y el aislamiento de las especies del género *Trichoderma* sp., en ninguno de los períodos de incubación. Por el contrario, sí observaron correlación entre la concentración de GP y el aislamiento de *Fusarium* sp. Para este último género, observaron que a medida que aumentó la dosis de herbicida el aislamiento fue mayor a los 9 y 15 días de incubación. Contrariamente, en el presente trabajo la recuperación de las especies de *Fusarium* sp., no se vio influenciada por los diferentes tratamientos con el herbicida. En cuanto a *Trichoderma* sp., se observó que las concentraciones de GP afectaron el aislamiento de las especies de este género, ya que a medida que aumentó la concentración de herbicida el recuento de *Trichoderma* sp. fue menor.

Existen diversos estudios, además de los analizados, acerca de los cambios en las comunidades microbianas del suelo producidos por la aplicación de GP. Zobiolo y col. (2010), estudiaron el efecto del GP en la rizósfera de plantas de soja resistentes a GP. Dichos autores encontraron que la colonización por *Fusarium* sp. aumentó en respuesta a las aplicaciones de GP, mientras que otros microorganismos de la rizósfera como *Pseudomonas* sp., bacterias reductoras de Mn y rizobacterias productoras de ácido indol acético, disminuyeron en respuesta al herbicida. Además observaron que la biomasa de la raíz y del brote de la planta también disminuyó a mayores dosis de GP, lo cual indica que la influencia del herbicida sobre el crecimiento de las plantas se produce a través de su efecto sobre las comunidades

microbianas benéficas de la rizósfera que podrían estar aportando nutrientes al cultivo. Zabaloy y col. (2012) estudiaron el efecto de la aplicación de GP en ensayos en microcosmos de suelo con y sin exposición previa al herbicida, sobre la respiración microbiana y sobre la estructura y abundancia de la comunidad bacteriana del suelo. Estos autores, observaron que la adición de GP al suelo provocó efectos mínimos en los parámetros de estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas. Sin embargo, obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la respiración microbiana luego de los tratamientos con el herbicida al comparar los microcosmos de suelo con y sin exposición previa. En el suelo sin previa exposición observaron un aumento en la respiración respecto al tratamiento control, mientras que en el suelo con exposición, observaron una disminución en este parámetro. Esto indica que en suelos sin antecedentes de exposición a GP, la adición del mismo provocaría un estrés en las comunidades nativas, lo cual se refleja en una mayor respiración con respecto a las comunidades nativas de suelo con previa exposición las cuales estarían aclimatadas al herbicida y podrían metabolizarlo con mayor rapidez. Duke y col. (2012) estudiaron el efecto del GP sobre la nutrición mineral de las plantas, la microbiota de la rizósfera de los cultivos y las enfermedades de las plantas en cultivos resistentes a GP. Estos investigadores midieron el efecto del GP sobre las comunidades microbianas del suelo a través de la respiración del suelo. Este parámetro no se vio afectado con dosis de herbicida inferiores a 50 mg/Kg, mientras que con dosis mayores a esta última y hasta 1500 mg/Kg, la respiración se estimuló. Estos resultados los atribuyen en parte al aumento del metabolismo microbiano producido por el GP (mineralización del N y P provenientes del herbicida) que produjeron un aumento en la respiración. Otros investigadores (Anza y col., 2016), estudiaron el efecto de la aplicación de GP sobre comunidades microbianas (bacterias y hongos), de la rizosfera de *Cortaderia selloana* en ensayos en microcosmos. Analizaron parámetros para evaluar la biomasa, actividad y diversidad de estas comunidades, tales como actividad enzimática, respiración, contenido de ergosterol, entre otros. Estos autores observaron que luego de aplicar el herbicida varios de los parámetros relacionados a la actividad fúngica, biomasa y biodiversidad aumentaron.

Los trabajos mencionados anteriormente estudiaron parámetros y grupos microbianos diferentes a los analizados en este trabajo, sin embargo, evidencian que la presencia de GP provoca cambios en las comunidades del suelo y puede actuar como un agente de selección permitiendo la supervivencia de aquellos grupos de microorganismos capaces de adaptarse al mismo e incluso metabolizarlo.

VI-2.1. Evaluación de la tolerancia a glifosato por la cepa *A. oryzae* AM₁ en presencia de la microbiota nativa.

La **figura 27** muestra el recuento de la cepa *A. oryzae* AM₁ aislada de los microcosmos acondicionados a 70 y 30 %_H y con el agregado de tres concentraciones de GP (10, 20 y 50 mg/Kg) a lo largo del período de incubación. De los factores estudiados, el tiempo de incubación y la %_H tuvieron un efecto significativo sobre el recuento de *A. oryzae* ($p < 0,05$). Por el contrario, la concentración de GP, ni todas las interacciones posibles entre los factores analizados, influyeron significativamente sobre el recuento de esta cepa fúngica. De los diferentes períodos muestreados, el valor más bajo del recuento de *A. oryzae* se observó a los 30 y 50 días (valores medios de 4,52 y 4,24 log₁₀ UFC/g respectivamente). Mientras que, a los 20 y 60 días se registraron valores significativamente más elevados (valores medios de 5,00 y 4,86 log₁₀ UFC/g respectivamente). A los 10 y 40 días no se observaron diferencias significativas respecto de los demás períodos. En cuanto a la %_H, a 30 %_H se observó un recuento significativamente mayor (4,83 log₁₀ UFC/g) con respecto al recuento registrado a 70 %_H (4,48 log₁₀ UFC/g) ($p < 0,05$).

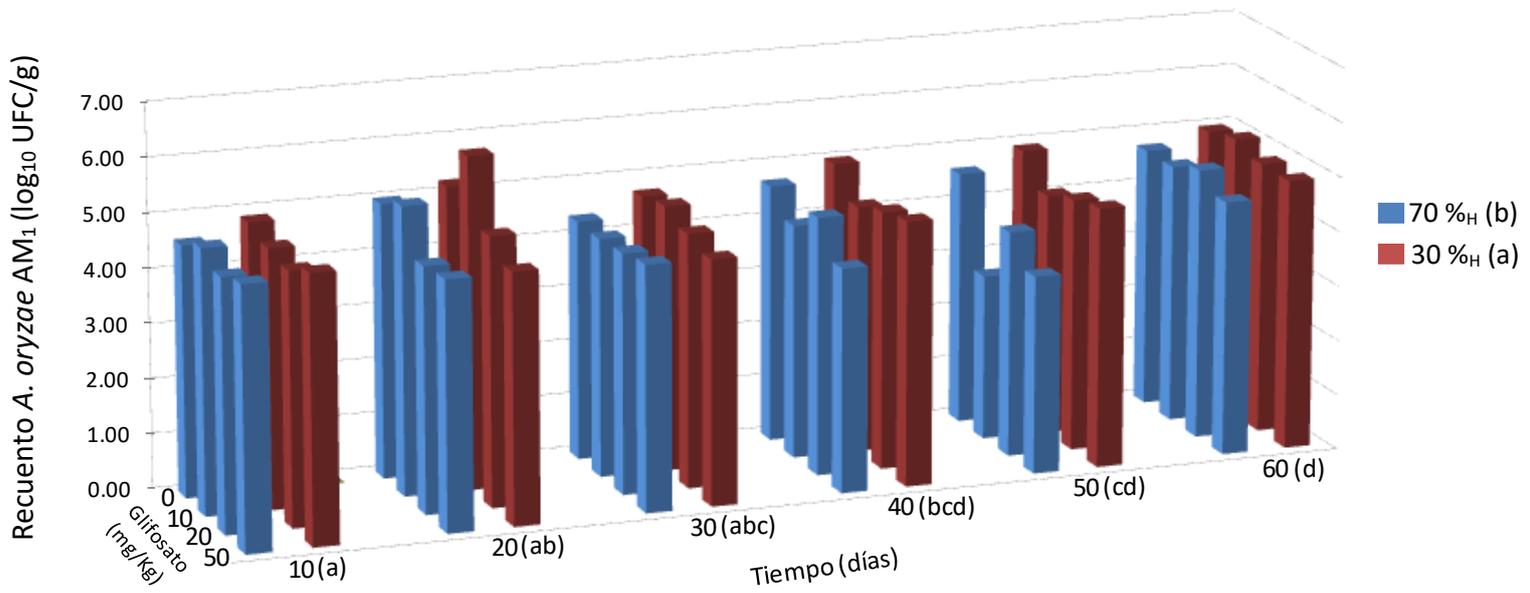


Figura 27. Recuento de *A. oryzae* AM₁ (log₁₀ UFC/g) de suelos acondicionados a 70 y 30 %_H sin (control) y con diferentes concentraciones de GP (10, 20 y 50 mg/Kg) en ensayos de microcosmos. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de recuentos de los tratamientos analizados en cada período de muestreo. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acuerdo al test LSD.

En la **figura 28** se muestran placas representativas, donde se puede observar la prevalencia de la cepa de *Aspergillus oryzae* AM₁ en relación a la microbiota nativa del suelo agrícola.

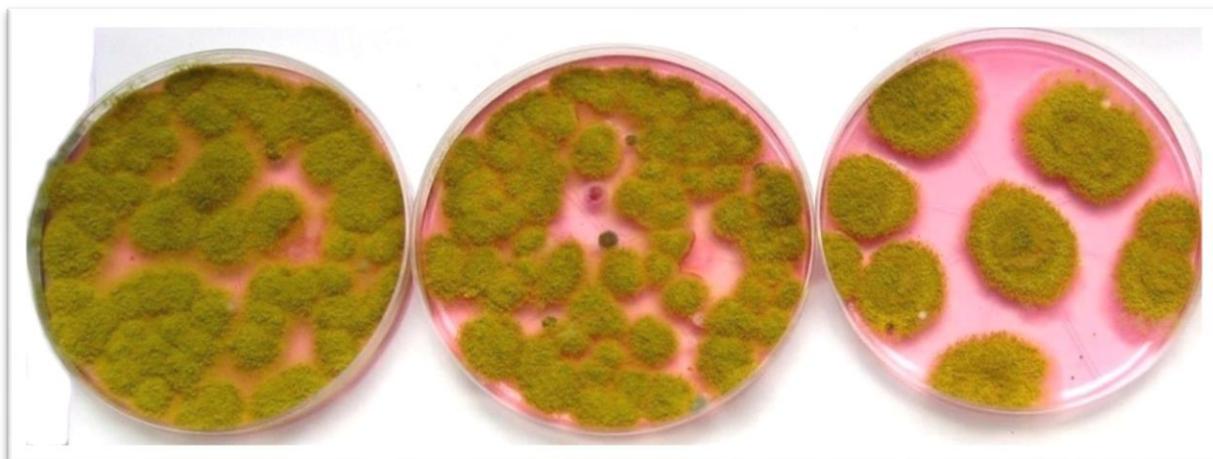


Figura 28. Placas representativas con la cepa *A. oryzae* AM₁ aislada en medio DRBC. Las mismas corresponden a la dilución 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , de los microcosmos con 10 mg/Kg de GP, al día 30 de incubación a 30 °H.

Al analizar el comportamiento de la cepa AM₁ frente a la microbiota nativa de suelo no se encontraron diferencias significativas en cuanto al recuento de las mismas bajo los tratamientos analizados ($p > 0,05$). A su vez, los recuentos tanto de la microbiota nativa como los de *A. oryzae* no fueron afectados por la %H ensayada ($p > 0,05$). Por lo tanto, el análisis se realizó para cada %H, a fin de evaluar el efecto de las concentraciones de GP evaluadas y el tiempo de incubación sobre el recuento de *A. oryzae* y la microbiota nativa.

A 30 %H (**Figura 29**), la interacción entre la concentración de GP y el tiempo de incubación influyó significativamente en el recuento fúngico ($p < 0,05$). El mayor recuento, tanto para la microbiota nativa como para *A. oryzae* se observó a los 20 días de incubación, en el tratamiento control y con 10 mg/Kg de GP (5,9 y 5,1 \log_{10} UFC/g, respectivamente). A los 50 días de incubación se observó el menor valor de recuento, tanto para *A. oryzae* como para la microbiota nativa con 10 mg/Kg de GP (4,28 \log_{10} UFC/g), siendo estos valores significativamente menores que los registrados en el respectivo control ($p < 0,05$). En general, en los demás períodos muestreados y con las diferentes concentraciones de GP ensayadas, el recuento varió entre 4,9 y 4,36 \log_{10} UFC/g, siendo estas variaciones no significativas entre sí.

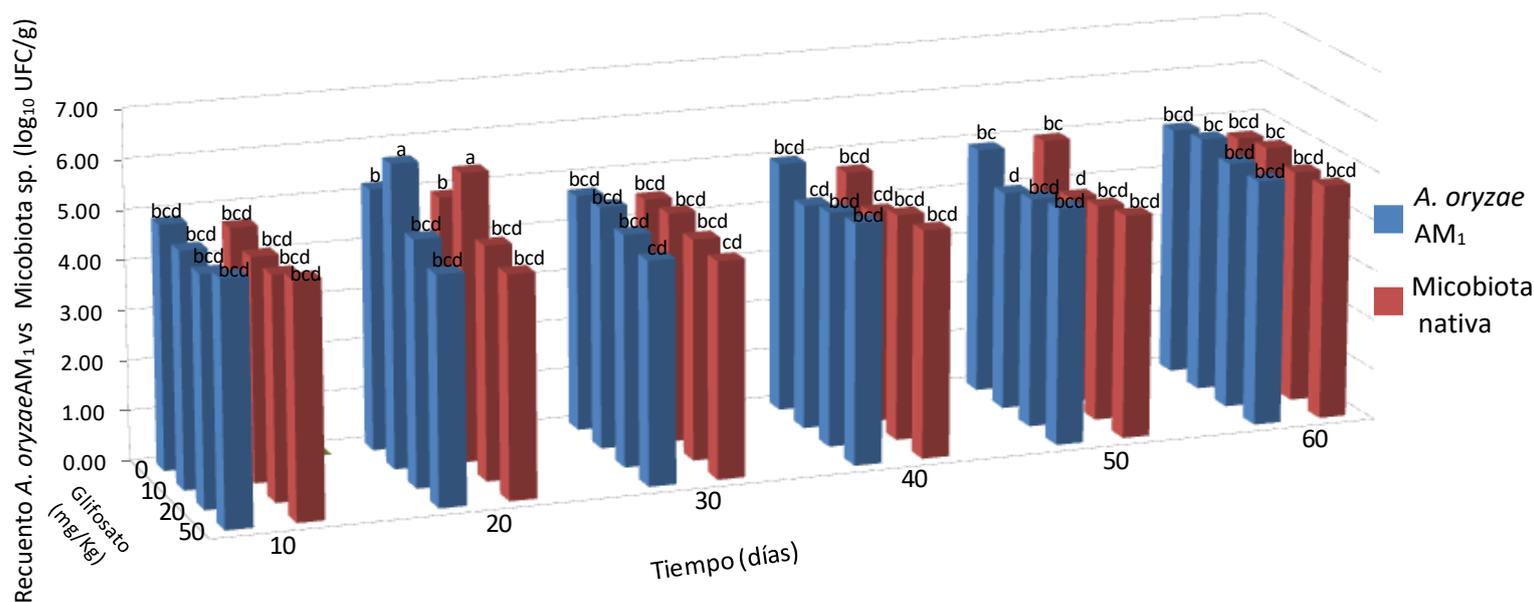


Figura 29. Recuento comparativo de *A. oryzae* AM₁ y de la microbiota nativa (log₁₀ UFC/g) de suelos acondicionados a 30 %_H y a diferentes concentraciones de GP (10, 20 y 50 mg/Kg) en ensayos de microcosmos y durante 60 días de incubación. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de recuentos totales en los tratamientos a 30 %_H. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acuerdo al test LSD.

A 70 %_H (**Figura 30**), al igual que para 30%_H, la interacción entre los factores estudiados influyeron significativamente en el recuento fúngico ($p < 0,05$). Los mayores recuentos se observaron a los 20 días de incubación, también en el tratamiento control y con 10 mg/Kg de GP (5,12 y 4,90 log₁₀ UFC/g, respectivamente). Mientras que, el recuento más bajo de *A. oryzae* y de la microbiota nativa, se registró a los 50 días de incubación, con concentraciones de 10 y 50 mg/Kg de GP (3,4 y 3,6 log₁₀ UFC/g respectivamente). En los demás períodos muestreados, los recuentos variaron entre 4,7 y 4,00 log₁₀ UFC/g, siendo estas variaciones no significativas entre sí.

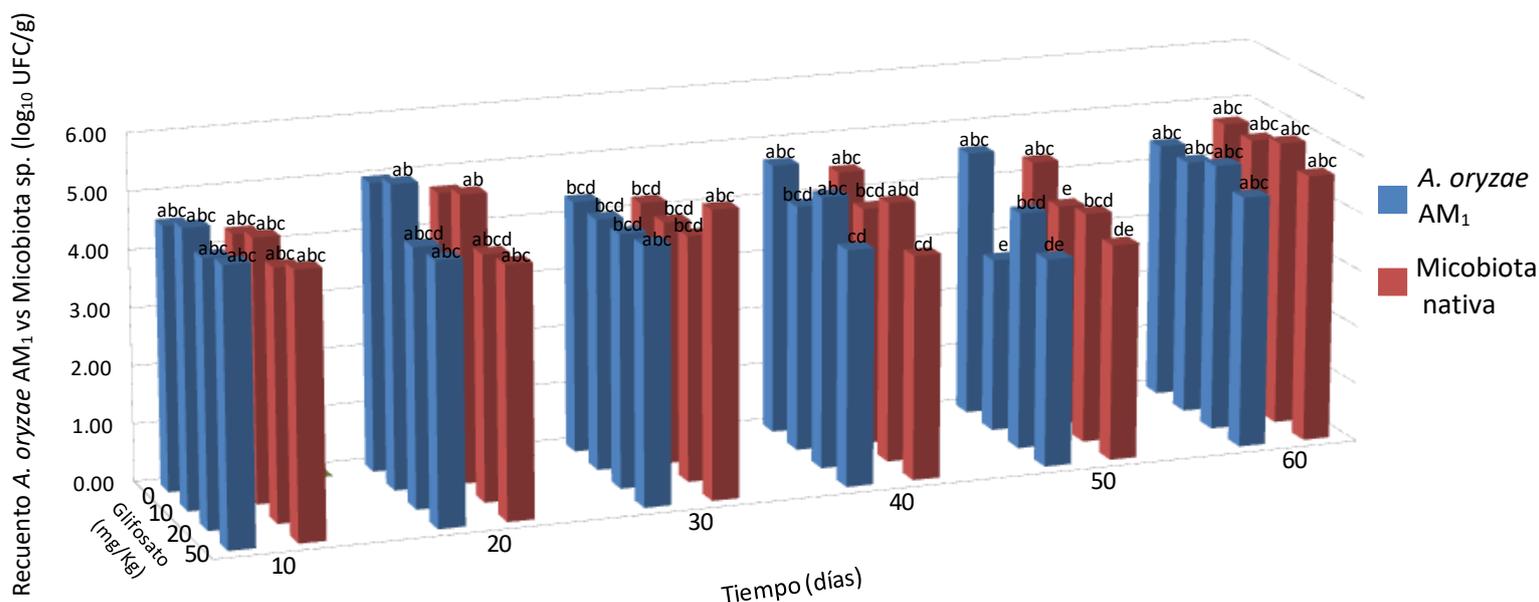


Figura 30. Recuento comparativo de *A. oryzae* AM₁ y de la microbiota nativa (log₁₀ UFC/g) en suelos acondicionados a 70 %H y a diferentes concentraciones de GP (10, 20 y 50 mg/Kg) y durante 60 días de incubación. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de recuentos totales en los tratamientos a 70%H. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes (p<0,05) de acuerdo al test LSD.

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que el recuento de la cepa de *Aspergillus oryzae* AM₁, aislada de suelos agrícolas, no se vio afectado por las dosis de GP ensayadas y, además, siendo capaz de mantenerse viable a lo largo de todo el período de incubación. Al comparar el recuento de la cepa de *A. oryzae* inoculada en los microcosmos con el recuento de la microbiota nativa, se evidenció que la microbiota presente en el suelo no afectó el recuento de la cepa en estudio; indicando la capacidad para competir de manera eficiente en su nicho ecológico.

Entre las variables estudiadas, la interacción entre las dosis de herbicida y el tiempo de incubación afectó el recuento tanto de la cepa en estudio como de la microbiota nativa. Se observó que para ambas %H, los mayores recuentos se obtuvieron en el control, con 10 mg/Kg de GP y a los 20 días de incubación, mientras que los recuentos más bajos se obtuvieron con 10 mg/Kg del herbicida y a los 50 días de incubación.

En los últimos años, han cobrado relevancia los problemas que conlleva la acumulación de GP en ambientes naturales (tanto suelo como agua), indicando la necesidad de desarrollar estrategias tendientes a estimular la remoción en los mismos (Sviridov y col. 2015). Algunos investigadores han observado que la inactivación del GP no es constante, debido a que se

han visto daños en algunas especies de plantas producidos por su actividad residual. Uno de los principales problemas son los residuos remanentes del herbicida que se acumulan, en particular luego de veranos secos, debido a que la degradación es más lenta en estas condiciones, pudiendo llegar a representar un riesgo de fitotoxicidad para los cultivos siguientes. Por lo tanto encontrar microorganismos capaces de tolerar y degradar el herbicida en los ambientes contaminados conlleva un gran desafío a fin de disminuir los niveles del mismo (Damalas y Eleftherohorinos, 2011; Huber, 2012).

En trabajos previos fue evaluado el efecto del GP sobre el crecimiento de diferentes cepas de *Aspergillus* sp. Carranza y col. (2014), estudiaron *in vitro* el efecto de diferentes concentraciones de GP y diferentes valores de potencial mátrico (Ψ) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y fase de latencia de cepas no toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi*. Estos autores observaron que las cepas analizadas fueron capaces de crecer en medios a base de suelo con diferentes dosis del herbicida y bajo diferentes Ψ . Si bien los parámetros analizados del presente trabajo son diferentes, en general hay concordancia entre los resultados encontrados. Además observaron que la fase de latencia y la velocidad de crecimiento estuvieron significativamente influenciadas por la concentración de GP ensayada; con disminución de la fase de latencia a medida que aumentó la dosis del herbicida. Mientras que, la velocidad de crecimiento, incrementó bajo algunas concentraciones de GP. Conclusiones similares también fueron informadas por Barberis y col. (2013), en estudios *in vitro* con cepas toxicogénicas de *A. flavus*. Estos resultados concuerdan parcialmente con el comportamiento de la cepa *A. oryzae* AM₁ en el presente trabajo ya que, las dosis de herbicida ensayadas (10, 20 y 50 mM) no afectaron significativamente el recuento de la misma. Sin embargo, cuando se comparó el recuento de la cepa AM₁ con el del recuento de la micobiota, los mayores recuentos se obtuvieron a concentraciones más bajas de GP.

En un trabajo más reciente, Carranza y col. (2016) analizaron *in vitro* dosis mayores de GP (100, 200, 300, 400, 450 y 500 mM) y diferentes a_w (0,995 y 0,980) sobre los parámetros de crecimiento de las mismas cepas analizadas en el presente estudio. Estos autores observaron que, a medida que aumentó la concentración del herbicida también aumentó la fase de latencia y en concordancia, disminuyó la velocidad de crecimiento. Esto concuerda con los resultados observados en el presente estudio ya que, los menores recuentos se obtuvieron con las mayores dosis de GP ensayadas.

Otros investigadores han evaluado el efecto del GP sobre diferentes parámetros de crecimiento de otras especies fúngicas. Nicolás y col. (2016), evaluaron el potencial de toxicidad de una formulación comercial de Roundup® (R450) como así también de su principio activo, denominado "GP técnico" sobre la capacidad de germinación de los conidios de *Aspergillus nidulans*, en medios con diferentes dosis de ambos herbicidas. Estos autores

encontraron una respuesta dependiente de la concentración de GP tanto para el formulado comercial como para el GP técnico, sin diferencias entre ambos. Además, observaron que a medida que las dosis aumentaban, la supervivencia de las esporas asexuales disminuía drásticamente, incluso en diluciones de hasta 100 veces más bajas que lo utilizado a campo. A su vez, analizaron la tasa de crecimiento de *A. nidulans*, observando también que disminuía cuando las dosis de los herbicidas aumentaban. Estos resultados no son comparables con el presente trabajo, ya que las dosis de herbicida ensayadas no afectaron los recuentos de la cepa *A. oryzae* AM₁ en los microcosmos de suelo. En un trabajo realizado por Arfarita y col. (2016), se evaluó la aplicación de una cepa de *Trichoderma viride* en suelo contaminado con GP. Estos autores observaron que esta cepa fue capaz de colonizar el nicho ecológico, mantenerse y establecerse en el mismo ya que los recuentos de la misma aumentaron al final de la experiencia realizada. Estos resultados son comparables a los observados en el presente trabajo, ya que los recuentos de la cepa *A. oryzae* AM₁, se mantuvieron constantes y en algunos casos aumentaron a medida que transcurrió el tiempo de incubación en los microcosmos en los que se aplicó el herbicida.

Otros estudios llevados a cabo en Brasil en microcosmos con suelo forestal bioaumentados con *Aspergillus* sp. en ensayos en microcosmos, demostraron la eliminación de benzo-antraceno y en menor medida de benzo-pireno (Serrano-Silva y col. 2009). Diferentes cepas de *Aspergillus* sp. se han evaluado en la degradación de plaguicidas, como por ejemplo atrazina (Sene y col., 2010), pendimetalina (Caihong y col., 2011) y oxifluorfen (Mohamed y col., 2011). Actualmente, varias especies pertenecientes a este género fúngico están en estudio debido a su alto potencial de producción de enzimas inespecíficas capaces de degradar plaguicidas organofosforados (Fu y col., 2016; 2017; Shah y col., 2017).

En base al análisis de los resultados obtenidos, se puede decir que la cepa AM₁ es capaz de tolerar diferentes dosis de GP, permaneciendo en los microcosmos de suelo aún en presencia de la microbiota nativa del suelo. Esto evidencia una capacidad potencial como agente de biorremediación. Estos resultados determinan las futuras investigaciones tendientes a evaluar la capacidad de remover GP por esta cepa en condiciones de invernadero y en suelos contaminados.

VII- Conclusiones

En base a la evaluación y discusión de los resultados se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- La cepa *A. oryzae* AM₁ es capaz de remover una alta concentración de glifosato presente en el medio (10 mM) como única fuente de fósforo, sólo en condiciones óptimas de disponibilidad de agua (0,98 y 0,99 a_w) con porcentajes de remoción cercanos al 50%.
- A la menor condición de actividad acuosa (0,95), la cepa *A. oryzae* AM₁, no fue capaz de remover ninguna de las dosis de glifosato ensayadas.
- El mayor desarrollo de biomasa fúngica se evidenció en la más alta concentración de glifosato (10 mM) a las 3 a_w ensayadas (0,95, 0,98 y 0,99), siendo más evidente en las condiciones de disponibilidad de agua óptimas.
- En los ensayos en microcosmos, los géneros fúngicos aislados en mayor frecuencia durante los 60 días de incubación fueron *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., y *Mucor* sp. en suelos con diferentes dosis de GP; cuyos recuentos no fueron significativamente afectados. Los recuentos de éstos géneros fúngicos no se modificaron significativamente con el aumento de la concentración de GP.
- En los ensayos en microcosmos, la cepa *A. oryzae* AM₁ fue capaz de tolerar diferentes concentraciones de glifosato (10, 20 y 50 mM) incorporadas al suelo a dos condiciones de humedad (30 y 70) y mantenerse viable durante todo el período de incubación en presencia de la microbiota nativa.
- La tolerancia a glifosato que presenta esta cepa de *A. oryzae* nativa de suelo, plantea la posibilidad de su potencial uso como agente de biorremediación.

VIII- Bibliografía

- Abarca, M.L. (2000). Taxonomy and identification of the species involved in nosocomial aspergillosis. *Revista Iberoamericana de Micología*; 17: 79-84.
- Accinelli, C., Koskinen, W.C., Seebinger, J.D., Vicari, A. y Sadowsky, M.J. (2005). Effects of incorporated corn residues on glyphosate mineralization and sorption in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53: 4110-7117.
- Alaniz-Zanon, M.S., Chiotta, M.L., Giaj-Merlera, G., Barros, G. y Chulze S. (2013). Evaluation of potential biocontrol agent for aflatoxin in Argentinean peanuts. *International Journal of Food Microbiology*; 162: 220–225.
- Anderson, J.A. y Kolmer, J.A. (2005). Rust control in glyphosate tolerant wheat following application of the herbicide glyphosate. *Plant Disease Journal*; 89: 1136–1142.
- Anza, M., Epelde, L., Artetxe, U., Becerril, J.M. y Garbisu, C. (2016). Control of *Cortaderia selloana* with a glyphosate-based herbicide led to a short-term stimulation of soil fungal communities. *Environmental Monitoring and Assessment*; 188: 1–6.
- Aparicio, V.C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P. y Costa, J.L. (2013). Environmental fate of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere*; 93: 1866–1873.
- Araújo, A., Monteiro, R. y Abarkeli, R. (2003). Effect of glyphosate on microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*; 52: 799-804.
- Arfarita, N., Djuhari-Prasetya, B. y Imai, T. (2016). The application of *Trichoderma viride* strain frp 3 for biodegradation of glyphosate herbicide in contaminated land. *Agrivita Journal of Agricultural Science*; 38: 275-281.
- ArgenBio. (2016). Cultivos aprobados y adopción. Disponible en: <http://www.argenbio.org/>. Fecha de acceso: mayo 2017.
- Balajee, S.A., Gribskov, J.L., Hanley, E., Nickle, D. y Marr, K.A. (2005). *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryotic Cell*; 4: 625-632.
- Barberis, C.L., Carranza, C.S., Chiacchiera, S.M. y Magnoli, C.E. (2013). Influence of herbicide glyphosate on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from soil on *in vitro* assay. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*; 48: 1070–1079.
- Bastos, A. (2008). Microbial volatile fingerprints: potential use for soil/water diagnostics and correlation with traditional microbial parameters, PhD Thesis, University of Cranfield, Silsoe, UK.

- Battaglin, W.A., Meyer, M.T., Kuivila, K.M. y Dietze, J.E. (2014). Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. *Journal of the American Water Resources Association*; 50: 275-290.
- Bolsa de Cereales (2017). Estimaciones agrícolas. Panorama agrícola semanal. Disponible en: <http://www.bolsadecereales.com/>. Fecha de acceso: abril 2017.
- Bolsa de Comercio de Rosario (2016). Informativo semanal. Marzo 2016. Disponible en: <http://www.bcr.com.ar/default.aspx>. Fecha de acceso: abril 2017.
- Borjesson, E., Torstensson, L., Blum, A., Narbondo, L., Oyhantcabal, G. y Sancho, D. (2008). Soja transgénica y su impacto en Uruguay. La nueva colonización. A, Pp 886.
- Bouchiat, R., Veignie, E., Grizard, D., Soebert, C., Vigier, M. y Rafin, R. (2015). Ability of filamentous fungi to degrade four emergent water priority pollutants. *Desalination and Water Treatment*; 57: 6740-6746.
- Bradberry, S.M., Proudfoot, A.T. y Vale J.A. (2004). Glyphosate poisoning. *Toxicological Reviews*; 23: 159-167.
- Braja, B. y Alfonso, D. (2005). Amonimethylphosponic acid and glyphosate adsorption onto goethite: a comparative study. *Environmental Science and Technology*; 39: 585-592.
- Burger, M. y Fernandez, S. (2004). Exposición al herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos. *Revista Médica del Uruguay*; 20:202-207.
- Busse, M., Ratcliff, A., Shestak, C. y Powers, R. (2001). Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*; 33: 1777-1789.
- Caihong, Y., Yingnan, S., Ronghua, L., Hui, J. y Xiaojun, W. (2011). Biodegradation of Pendimethalin by two fungus strains isolated from soil in China. *Bioinformatics and Biomedical Engineering, 5th International Conference*; 1-5.
- Carranza C.S., Bergesio M.V., Barberis C.L., Chiacchiera S.M. y Magnoli C.E. (2014). Survey of *Aspergillus* section *Flavi* presence in agricultural soils and effect of glyphosate on non-toxicogenic *A. flavus* growth on soil based medium. *Journal of Applied Microbiology* 116: 1229-1240.
- Carranza, C.S., Barberis, C.L., Chiacchiera, S.M., Dalcerro, A.M. y Magnoli, C.E. (2016). Isolation of culturable mycobiota from agricultural soils and determination of tolerance to glyphosate of nontoxicogenic *Aspergillus* section *Flavi* strains. *Journal of Environmental Science and Health, part B*; 51: 35-43.

- Carranza, C.S., Barberis, C.L., Chiacchiera, S.M. y Magnoli, C.E. (2017). Assessment of growth of *Aspergillus* sp agricultural soils in the presence of glyphosate. Revista Argentina de Microbiología. doi: 10.1016/j.ram.2016.11.007.
- CAST. Council of Agricultural Science and Technology (2003). Micotoxins: Risks in plant, animal and humans systems., CAST, Ames, IA. Task Force Report N° 139.
- Castro, J.V., Peralba, M.C.R. y Ayub, M.A.Z. (2007). Biodegradation of the herbicide glyphosate by filamentous fungi in platform shaker and batch bioreactor. Journal of Environmental Science and Health, part B; 42: 883–886.
- CONICET. Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas (2009), Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos decreto 21/2009. Evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Disponible en: <http://www.msal.gob.ar/agroquimicos/pdf/INFORME-GLIFOSATO-2009-CONICET.pdf>. Fecha de acceso: octubre de 2017.
- Costa, M., Torres, M., Magariños, H. y Reyes, A. (2010). Producción y purificación parcial de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. Revista Colombiana de Biotecnología; 11: 163-175.
- Damalas, C.A. y Eleftherohorinos, I.G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. International Journal of Environmental Research and Public Health; 8: 1402-1419.
- Dick, R. y Quinn, J. (1995). Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. Applied Microbiology Biotechnology; 43: 545-550.
- Dong-Mei, Z., Yu-Jun, W., Long, C., Xiu-Zhen, H. y Xiao-San, L. (2004). Adsorption and co-sorption of cadmium and glyphosate on two soils with different characteristics. Chemosphere; 57: 1237–1244.
- Dorner, J.W. (2010). Efficacy of a biopesticide for control of aflatoxins in corn. Journal of Food Protection; 73: 495–499.
- Duke, S.O., Lydon, J., Koskinen, W.C., Moorman, T.B., Chaney, R. L. y Hammerschmidt, R. (2012). Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosate-resistant crops. Journal of Agricultural and Food Chemistry; 60: 10375–10397.
- EFSA. European Food Safety Authority. (2012). Scientific opinion on an application (EFSA-GMO-NL-2005-24) for the placing on the market of the herbicide tolerant genetically modified soybean 40-3-2 for cultivation under Regulation (EC). N°

1829/2003 from Monsanto. Disponible en: www.efsa.europa.eu/efsajournal. Fecha de acceso: mayo 2017.

- EPA. Agencia de protección ambiental de Estados Unidos. (2017). Infórmese: plaguicidas. Disponible en: <https://espanol.epa.gov/>. Fecha de acceso: mayo 2017.
- Esperbent, C. (2016). La ingeniería detrás de un cultivo. *Revista de investigaciones agropecuarias*; 42: 125-130.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. (2006). Versión revisada. Disponible en: <http://www.fao.org/home/es/>. Fecha de acceso: mayo 2017.
- Feng, P.C.C., Baley, G.J., Clinton, W.P., Bunkers, G.J., Alibhai, M.F., Paulitz, T.C. y Kidwell, K.K. (2005). Glyphosate inhibits rust diseases in glyphosate-resistant wheat and soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 48: 17290–17295.
- Fernández, M.R., Zentner, R.P., Basnyat, P., Gehl, D., Selles, F. y Huber, D. (2009). Glyphosate associations with cereal diseases caused by *Fusarium* sp. in the Canadian Prairies. *European Journal of Agronomy*; 31: 133-143.
- Fu, G.M., Chen, Y., Li, R., Yuan, X., Liu, C., Li, B. y Wan, Y. (2017). Pathway and rate-limiting step of glyphosate degradation by *Aspergillus oryzae* A-F02. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. Doi: 10.1080/10826068.2017.1342260.
- Fu, G.M., Li, R., Li, K., Hu, M., Yuan, X., Li, B., Wang, F., Liu, C. y Wan, Y. (2016). Optimization of liquid-state fermentation conditions for the glyphosate-degradation enzyme production of strain *Aspergillus oryzae* by ultraviolet mutagenesis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*; 46(8): 780–787.
- Garry, V.F., Harkins, M.E., Erickson, L.L., Long-Simpson, L.K., Holland, S.E. y Burroughs, B.L. (2002). Birth defects, season of conception, and sex of children born to pesticide applicators living in the Red River Valley of Minnesota, USA. *Environmental Health Perspectives*; 110: 441–449.
- Geiser, D.M. (2004). Practical molecular taxonomy of fungi. In: *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Medicine and Agriculture*. Kluwer Academic Publishers. Pp. 1-12.
- Giesy, J.P., Dobson, S. y Solomon, K.R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*; 167: 35-120.
- Gomez, E., Ferreras, L., Lovotti, L. y Fernandez, E. (2009). Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. *European Journal of Soil Biology*; 45: 163-167.

- Haney, R., Senseman, S., Hons, F. y Zuberer, D. (2000). Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science*; 48: 89-93.
- Hanson, K.G. y Fernandez, M.R. (2003). Glyphosate herbicides affect plant pathogenic fungi. *Canadian Journal of Plant Pathology*; 25: 120.
- Hokanson, R., Fudge, R., Chowdhary, R. y Busbee, D. (2007). Alteration of estrogen-regulated gene expression in human cells induced by the agricultural and horticultural herbicide glyphosate. *Human and Experimental Toxicology*; 26: 747-752.
- Horn, B.W. (2003). Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. *Journal of Toxicology Toxin Reviews*; 22: 351–379.
- Houbraken, J. y Samson, R.A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology*; 70: 1–51.
- Houbraken, J., Vries, R.P. de y Samson, R.A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in Applied Microbiology*; 86: 199–249.
- Huang, X., He, J., Yan, X., Hong, Q., Chen, K., He, Q., Zhang, L., Liu, X., Chuang, S., Li, S. y Jiang, J. (2016). Microbial catabolism of chemical herbicides: Microbial resources, metabolic pathways and catabolic genes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Doi: 10.1016/j.pestbp.2016.11.010.
- Huber, D. (2012). Glyphosate hazards to crops, soils, animals, and consumers. *USDA Scientist Reveals All*. Pp: 5.
- Hubka, V., Nováková, A. y Kolarík, A. (2014). Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov. *Mycology*; 7: 169-208.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. (2017). Disponible en: <https://www.iarc.fr/>. Fecha de acceso: septiembre 2017.
- Ibañez, M., Pozo, O.J., Sancho, J.V., López, F.J. y Hernández F. (2005). Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*; 108: 145-155.
- INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (2015). Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente. 1° edición. Balcarce, Buenos Aires; Famaillá, Tucumán; Reconquista, Santa Fe. Ediciones INTA, 2015, 73 páginas.
- INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (2017). Informe estadístico mercado de la soja. Disponible en: <http://inta.gob.ar/>. Fecha de acceso: abril 2017.

- James, C. (2015). 20th Anniversary (1996 to 2015) of the Global Commercialization of Biotech Crops and Biotech Crop Highlights in 2015. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Brief N° 51. New York.
- King, E.D., Bassi, A.B., Ross, D.C. y Druebbisch, B. (2011). An industry perspective on the use of atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* as biological control agents and the significance of cyclopiazonic acid. *Toxin Reviews*; 30: 33–34.
- Klich, M.A. (2002) Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycology*; 94: 21–27.
- Kovach, J., Petzoldt, C., Degni, J. y Tette, J.A. (2008). Method to measure the environmental impact of pesticides. New York's Food and Life Sciences Bulletin Disponible en: <http://www.nysipm.cornell.edu/publications/EIQ.html>. Fecha de acceso: abril 2017.
- Kryuchkova, Y. V., Burygin, G. L., Gogoleva, N. E., Gogolev, Y. V., Chernyshova, M. P., Makarov, O.E., Fedorov, E.E. y Turkovskaya, O.V. (2014). Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. *Microbiological Research*; 169: 99-105.
- Krzysko-Lupicka, T. y Orlik, A. (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.
- Krzysko-Lupicka, T. y Sudol, T. (2008). Interactions between glyphosate and autochthonous soil fungi surviving in aqueous solution of glyphosate. *Chemosphere*; 71: 1386- 1391.
- Li, Z., Bai, T., Dai, L., Wang, F., Tao, J., Meng, S., Hu, Y., Wang, S. y Hu, S. (2016). A study of organic acid production in contrast between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Scientific Reports*; 6: 25313: 1-8.
- Lueken, A., Juhl-Strauss, U., Krieger, G. y Witte, I. (2004). Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H₂O₂) and non genotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. *Toxicology Letters*; 147: 35-43.
- Madsen, K.H. y Streibig, J.C. (2004). Manejo de malezas para países en desarrollo. FAO. Disponible en: <http://www.fao.org/home/es>. Fecha de acceso: mayo 2017.
- Martínez, M.T., Cabrera, J.L. y Herrera, L. (2004). Las plantas transgénicas, una visión integral. *e-Gnosis*; 2: Artículo 2. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oaid=73000202>. Fecha de acceso: abril 2017.
- Marín, S., Sanchis, V., Teixido, A., Saenz, R., Ramos, A. J., Vinas, I. y Magan, N. (1996). Water activity, temperatura and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme*

and *Fusarium proliferatum* isolated from maize. Canadian Journal of Microbiology; 41: 1063-1070.

- Meriles, J.M., Vargas Gil, S., Haro, R.J., March, G. J. y Guzman, C.A. (2006). Glyphosate and previous crop residue effect on deleterious and beneficial soil-borne fungi from a peanut–corn–soybean rotations. Journal of Phytopathology; 154: 309–316.
- Ministerio de Agroindustria (2017). Presidencia de la Nación. Dirección de estimaciones agrícolas y delegaciones. Disponible en: <http://www.agroindustria.gob.ar/>. Fecha de acceso: abril 2017.
- Mladinic, M., Berend, S., Vrdojak, A.L., Kopjar, N., Radic, B. y Zeijezic, D. (2009). Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes *in vitro*. Environmental and Molecular Mutagenesis; 50: 800-807.
- Mohamed, A.T., El-Hussain, A.A., El-Siddig, M.A. y Osman, A.G. (2011). Degradation of oxyfluorfen herbicide by soil microorganisms bio-degradation of herbicides. Biotechnology; 10: 274-279.
- Monsanto (2015). Productos: el glifosato y los herbicidas Roundap. Disponible en: <http://www.monsanto.com/pages/default.aspx>. Fecha de acceso: mayo 2017.
- Nesci, A. y Etcheverry, M. (2002). *Aspergillus* section *Flavi* populations from field maize in Argentina. Letters in Applied Microbiology; 34: 343-348.
- Nesci, A., Barros, G., Castillo, G. y Etcheverry, M. (2006). Soil fungal population in preharvest maize ecosystem in different tillage practices in Argentina. Soil and Tillage Research; 91: 143–149.
- Nicolas, V., Oestreicher, N. y Vélot, C. (2016). Multiple effects of a commercial Roundup® formulation on the soil filamentous fungus *Aspergillus nidulans* at low doses: evidence of an unexpected impact on energetic metabolism. Environmental Science and Pollution Research; 23: 14393-14404.
- Niu, J., Arentshorts, M., Nair, D.S., Dai, Z., Baker, S.E., Frisvad, J.C., Nielsen, K.F., Punt, P.J. y Ram, A.F. (2015). Identification of classical mutant in the industrial host *Aspergillus niger* by systems genetics: LaeA is required for acid citric production and regulates the formation of some secondary metabolites. G3 Genes, Genome, Genetics; 6: 193-204.
- Olega (2017). Compañía: unidades de negocio, maní. Disponible en: <http://www.olega.com.ar>. Fecha de acceso: abril 2017.
- Olmedo, F.G. (1998). La tercera revolución verde: plantas con luz propia. Editorial: Debate,.Pp: 209.

- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2017). Temas de salud: Salud ambiental. Disponible en: <http://www.who.int/es/>. Fecha de acceso: septiembre 2017.
- Pérez Jones, A., Polge Park, K., Colquhoun, J. y Mallory-Smith, C.A. (2007). Investigating the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta*; 226: 395-404.
- Peterson S.W. (2000). Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. En: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Samson, R.A. y Pitt, J.I. (Editores). Harwood Academic Publishers. Pp: 323-355.
- Peterson, S.W. (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycology*; 100: 205-226.
- Peterson, S.W., Varga, J., Frisvad, J.C., y Samson, R.A. (2008). Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus*. *Aspergillus in the Genomic Era*. Pp: 33–56.
- Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (2006). Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia*; 162: 233–243.
- Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (2009). Fungi and food spoilage. CSIRO Division of Food Science and Technology Sydney Accademic, Press. Australia. Tercera edición.
- Pitt, J.I. y Taylor, J.W. (2014). *Aspergillus*, its sexual states, and the new International Code of Nomenclature. *Mycology*; 106: 1051–1052.
- Pollegioni, L., Schonbrunn, E. y Siehl, D. (2011). Molecular basis of glyphosate resistance-different approaches through protein engineering. *The FEBS Journal*; 278: 2753-2766
- Powell, J.R. y Swanton, C.J. (2008). A critique of studies evaluating glyphosate effects on diseases associated with *Fusarium* sp. *Weed Research*; 48: 307-318.
- Prata, F., Camponez, V., Lvorenti, A., Tornisielo, V. y Borges, J. (2003). Glyphosate sorption and desorption in soils with distinct phosphorus levels. *Scientia Agricola*; 60: 175-180.
- Pringle, A., Baker, D.M., Platt, J.L., Wares, J.P., Latge, J.P. y Taylor, J.W. (2005). Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution*; 59: 1886-1899.
- Ratcliff, A.W., Busse, M.D. y Shestak, C.J. (2006). Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology*; 34: 114-124.
- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., y Seralini Gilles, E. (2005). Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Perspectives*; 113: 716-720.

- Saito, M., Tsuruta, O., Siriacha, P., Kawasugi, S., Manabe, M. y Buangsuwon, D. (1986). Distribution and aflatoxin production of the atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated from soils in Thailand. *Proceedings Japanese Association Mycotoxicology*; 24: 41–46.
- Samson, R.A. y Pitt, J.I. (2000). Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Harwood Academic Publishers.
- Samson, R.A. y Varga, J. (2007). *Aspergillus* systematics in the genomic era. *Studies in Mycology*; 59: 201-206
- Samson, R.A., Hong, S-B., Peterson, S.W., Frisvad, J.C. y Varga, J. (2007). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology*; 59: 147-207.
- Samson, R.A., Hong, S-B. y Frisvad, J.C. (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*; 44: 133-148.
- Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. y Andersen, B. (2010). Food and indoor fungi. Publisher: Utrecht, the Netherland: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Samson, R.A., Visagie, M.C., Houbraken, J., Hong S.B., Hubka, V., Klaassen, C.H.W, Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A. , Tanney, J.B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti G., Yaguchi, T., Frisvad, J.C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*; 78: 141-173.
- Sebiomo, A., Ogundero, V.W. y Bankole, S.A. (2011). Effect of four herbicides on microbial population, soil organic matter and dehydrogenase activity. *African Journal of Biotechnology*; 10: 770-778
- SENASA. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2017). Informaación: gestión ambiental. Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/>. Fecha de acceso: septiembre 2017.
- Sene, L., Converti, A., Ribeiro-Secchi, G.A. y García-Simão, R.C. (2010). New aspects on atrazine biodegradation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*; 53: 487-496.
- Serrano-Silva, I., da Costa dos Santos, E., Ragagnin de Menezes, C., Fonseca da Faria, A., Franciscan, E., Grossman, M. y Durrant, L.R. (2009). Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology*; 100: 4669-4675.
- Shah, P.C., Kumar, V.R., Dastager, S.G. y Khire, J.M. (2017). Phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 for a novel application to degrade organophosphorus pesticides. *AMB Express*; 7: 1-11.

- Sorensen, S.R., Schultz, A., Jacobsen, O.S. y Aamand, J. (2006). Sorption, desorption and mineralization of the herbicides glyphosate and MCPA in samples from two Danish soil and subsurface profiles. *Environmental Pollution*; 141: 184- 194.
- Sviridov, A.V., Shushkova, T.V., Ermakova, I.T., Ivanova, E.V., Epiktetov, D.O. y Leontievshy, A.A. (2015). Microbial degradation of glyphosate herbicides (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*; 51: 188–195.
- Torres, L.R. y Osorio, A.G. (2012). El Estado Actual del Proteoma de *Aspergillus*. *Bioteología*; 16: N°2.
- Varga, J., Frisvad, J. C., y Samson, R. A. (2010). *Aspergillus* section *Aeni* sect. nov., a new section of the genus for *A. karnatakaensis* sp. nov. and some allied fungi. *IMA Fungus*; 1: 197–205.
- Varga, J., Kocsubé, S., Tóth, B., Frisvad, J.C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M. y Samson, R.A. (2007). *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 57:1925-1932.
- Veana, F., Aguilar, C.N., Viader- Salvadó, J.M. y Rodríguez- Herrera, R. (2011). Invertasa de género *Aspergillus* y su impacto biotecnológico. *Bioteología*; volumen 15, N°1.
- Veiga, F., Zapata, J.M., Marcos, M.L.F. y Alvarez, E. (2001). Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north- west Spain. *Science of the Total Environment*; 271: 135-144.
- Wu, X., Fu, G.M., Yin, W., Guode, D., Chan, Y., Luo, Y.F. y Wu, X. (2010). Isolation and identification of glyphosate-degraded strain *Aspergillus oryzae* sp. A-F02 and its degradation characteristics. *Plant Diseases and Pests*; 1: 54-57.
- Zabaloy, M.C., Gómez, E., Garland, J.L. y Gómez M.A. (2012). Assessment of microbial community function and structure in soil microcosms exposed to glyphosate. *Applied Soil Ecology*; 61: 333-339
- Zain, N.M.M., Mohamad, R.B, Sijam, K., Morshed, M.M. y Awang, Y. (2013). Effect of selected herbicides *in vitro* and in soil on growth and development of soil fungi from oil palm plantation. *International Journal of Agriculture and Biology*; 15: 820–826.
- Zhou D., Wang Y., Cang L., Hao X. y Luo X. (2004). Adsorption and desorption of cadmium and glyphosate on two soils with different characteristics. *Chemosphere*; 57: 1237- 1244.
- Zobiolo, L.H.S., Kremer, R.J., Oliveira Jr, R. S. y Constantin. J. (2010). Glyphosate affects micro-organisms in rhizospheres of glyphosate-resistant soybeans. *Journal of Applied Microbiology*; 110: 118–127.

VIX- Anexo estadístico

Test de ANOVA

Interacciones entre los factores glifosato, %_H y días; y sus efectos simples en el recuento de la micobiota total por períodos.

Micobiota por períodos					
Interacción triple					
No aditividad	1	0.0813	0.0813	0.827	0.69
Residuos	34	3.3409	0.0912		
Interacciones dobles					
Glifosato-% _H					
Glifosato	3	0.8578	0.2859	2.332	0.08
% _H	1	0.2480	0.2479	2.022	0.16
Glifosato: % _H	3	0.3266	0.1088	0.888	0.45
Residuos	40	4.9036	0.1225		
Glifosato-día					
Glifosato	3	0.8578	0.2859	2.433	0.08
Día	5	1.4813	0.2962	2.521	0.05
Glifosato:día	15	1.1766	0.0784	0.667	0.78
Residuos	24	2.8201	0.1175		
% _H -día					
% _H	1	0.2480	0.2479	2.183	0.14
Día	5	1.4814	0.2962	2.609	0.04
% _H :día	5	0.5190	0.1037	0.914	0.48
Residuos	36	4.0877	0.1135		
Efectos simples					
Día					
Día	5	1.4814	0.2962	2.563	0.04
Residuos	42	4.8546	0.1155		
% _H					
% _H	1	0.2486	0.2479	1.873	0.17
Residuos	46	6.0887	0.1323		
Glifosato					
Glifosato	3	0.8579	0.2859	2.295	0.09
Residuos	44	5.4781	0.1245		

gl: grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: estadístico de Fisher, p: valor p.

Comparación entre los días de incubación con diferencias significativas.

Comparaciones entre días		
10	4.67	a
30	4.51	ab
20	4.50	ab
40	4.32	ab
60	4.21	b
50	4.18	b

Interacciones entre los factores glifosato, %_{oH} y días y sus efectos simples en el recuento de la cepa AM₁ por periodos.

Cepa AM ₁					
Interacción triple					
	gl	SC	CM	F	p
No aditividad	1	0.3267	0.3266	3.093	0.08
Residuos	34	3.5905	0.1056		
Interacciones dobles					
Glifosato-% _{oH}					
Glifosato	3	0.4338	0.1446	0.847	0.47
% _{oH}	1	1.4526	1.4546	8.504	0.005
Glifosato:% _{oH}	3	0.1844	0.0614	0.359	0.78
Residuos	40	6.8318	0.1707		
Glifosato-día					
Glifosato	3	0.4338	0.1446	1.175	0.33
Día	5	2.9146	0.5829	4.739	0.003
Glifosato:día	15	2.6022	0.1734	1.410	0.21
Residuos	24	2.9518	0.1229		
% _{oH} -día					
% _{oH}	1	1.4526	1.4525	13.45	0.007
Día	5	2.9146	0.5829	5.398	0.008
% _{oH} :día	5	0.6478	0.1295	1.199	0.21
Residuos	36	3.8875	0.1079		
Efectos simples					
Día					
Día	5	2.9146	0.5829	4.088	0.004
Residuos	42	5.9879	0.1424		
% _{oH}					
% _{oH}	1	1.4526	1.4526	8.96	0.004
Residuos	46	7.4499	0.1619		
Glifosato					
Glifosato	3	0.4338	0.1446	0.751	0.52
Residuos	44	8.4687	0.1924		

gl: grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: estadístico de Fisher, p: valor p.

Comparación entre los días de incubación con diferencias significativas.

Comparaciones entre días		
20	5	a
60	4.86	ab
10	4.73	ab
40	4.59	bc
30	4.52	bc
50	4.24	c

Comparación entre las %_{oH} con diferencias significativas.

Comparaciones entre % _{oH}		
30	4.83	A
70	4.48	B

Interacciones entre los factores glifosato, %_H y días y sus efectos simples en el recuento de *Aspergillus* sp. total por períodos.

Aspergillus sp. por períodos					
Interacción triple					
No aditividad	1	3.3250	3.3254	1.766	0.19
Residuos	34	64.006	1.8825		
Interacciones dobles					
Glifosato-% _H					
Glifosato	3	3.8101	1.2701	0.705	0.55
% _H	1	4.1712	4.1713	2.317	0.13
Glifosato: % _H	3	1.8568	0.6188	0.343	0.79
Residuos	40	71.989	1.7997		
Glifosato-día					
Glifosato	3	3.8101	1.2699	0.671	0.57
Día	5	4.6580	0.9315	0.492	0.77
Glifosato:día	15	27.596	1.8637	0.985	0.49
Residuos	24	45.403	1.8918		
% _H -día					
% _H	1	4.1711	4.1713	2.265	0.14
Día	5	4.6587	0.9316	0.506	0.76
% _H :día	5	6.7156	1.4330	0.729	0.60
Residuos	36	66.283	1.8412		
Efectos simples					
Día					
Día	5	4.6587	0.9315	0.507	0.76
Residuos	42	77.169	1.8373		
% _H					
% _H	1	4.1711	4.1713	2.470	0.12
Residuos	46	77.655	1.6882		
Glifosato					
Glifosato	3	3.8101	1.2702	0.716	0.54
Residuos	44	78.071	1.7731		

gl: grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: estadístico de Fisher, p: valor p.

Interacciones entre los factores glifosato, %_oH y días y sus efectos simples en el recuento de *Penicillium* sp. total por períodos.

Penicillium sp. por períodos					
Interacción triple					
No aditividad	1	1.9497	1.9487	0.960	0.33
Residuos	34	68.996	2.0293		
Interacciones dobles					
Glifosato-% _o H					
Glifosato	3	7.2355	2.4116	1.149	0.34
% _o H	1	2.4264	2.4255	1.156	0.28
Glifosato: % _o H	3	3.1277	1.0424	0.469	0.68
Residuos	40	83.912	2.0978		
Glifosato-día					
Glifosato	3	7.2357	2.4416	0.976	0.42
Día	5	12.965	3.5930	1.050	0.41
Glifosato:día	15	17.228	1.1485	0.465	0.93
Residuos	24	59.271	2.4696		
% _o H -día					
% _o H	1	2.4268	2.4255	1.294	0.26
Día	5	12.965	2.5930	1.383	0.25
% _o H:día	5	13.841	2.7682	1.477	0.22
Residuos	36	67.467	1.8741		
Efectos simples					
Día					
Día	5	12.965	2.5930	1.301	0.28
Residuos	42	83.734	1.9937		
% _o H					
% _o H	1	2.4266	2.4255	1.183	0.28
Residuos	46	94.274	2.0494		
Glifosato					
Glifosato	3	7.2354	2.4116	1.186	0.32
Residuos	44	89.464	2.0333		

gl: grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: estadístico de Fisher, p: valor p.

Interacciones entre los factores glifosato, aw y días y sus efectos simples en el recuento de *Fusarium* sp. total por períodos.

<i>Fusarium</i> sp. por períodos					
Interacción triple					
No aditividad	1	0.2922	0.2920	0.088	0.76
Residuos	34	111.90	3.2914		
Interacciones dobles					
Glifosato-aw					
Glifosato	3	6.5511	2.1838	0.639	0.59
% _{oH}	1	7.4976	7.4971	2.196	0.14
Glifosato: % _{oH}	3	3.1001	1.0333	0.302	0.82
Residuos	40	136.55	3.4137		
Glifosato-día					
Glifosato	3	6.5551	2.1838	0.601	0.62
Día	5	24.351	4.8701	1.341	0.28
Glifosato:día	15	35.640	2.3760	0.654	0.80
Residuos	24	87.156	3.6315		
% _{oH} -día					
% _{oH}	1	7.4948	7.4948	2.523	0.12
Día	5	24.351	4.8701	1.639	0.17
% _{oH} :día	5	14.914	2.9829	1.004	0.42
Residuos	36	106.93	2.9705		
Efectos simples					
Día					
Día	5	24.351	4.8701	1.581	0.18
Residuos	42	129.34	3.0797		
% _{oH}					
% _{oH}	1	7.4971	7.4971	2.358	0.13
Residuos	46	146.21	3.1783		
Glifosato					
Glifosato	3	6.5511	2.1838	0.653	0.58
Residuos	44	147.14	3.3442		

gl: grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: estadístico de Fisher, p: valor p.

Interacciones entre los factores glifosato, aw y días y sus efectos simples en el recuento de *Trichoderma* sp. total por períodos.

Trichoderma sp. por períodos					
Interacción triple					
No aditividad	1	0.4391	0.4394	0.196	0.66
Residuos	34	76.095	2.2370		
Interacciones dobles					
Glifosato-% _H					
Glifosato	3	24.830	8.2767	3.314	0.02
% _H	1	11.741	11.741	4.702	0.03
Glifosato: % _H	3	9.3733	3.1243	1.251	0.30
Residuos	40	99.874	2.4968		
Glifosato-día					
Glifosato	3	24.830	8.2767	2.308	0.10
Día	5	23.341	4.6682	1.302	0.29
Glifosato:día	15	11.610	0.7740	0.215	0.99
Residuos	24	86.037	3.5849		
% _H -día					
% _H	1	11.741	11.741	4.473	0.04
Día	5	23.341	4.6682	1.778	0.14
% _H :día	5	16.256	3.2512	1.238	0.31
Residuos	36	94.480	2.6244		
Efectos simples					
Día					
Día	5	23.341	4.6682	1.608	0.18
Residuos	42	122.47	2.9161		
% _H					
% _H	1	11.741	11.741	4.028	0.05
Residuos	46	134.07	2.9147		
Glifosato					
Glifosato	3	24.834	8.2767	3.011	0.04
Residuos	44	120.99	2.7497		

gl: grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: estadístico de Fisher, p: valor p.

Comparación entre las dosis de glifosato con diferencias significativas.

Comparaciones entre glifosato		
0	2.58	a
10	2.34	a
20	1.81	ab
50	0.71	b

Interacciones entre los factores glifosato, aw y días y sus efectos simples en el recuento de *Mucor* sp. total y por períodos.

Mucor sp. por períodos					
Interacción triple					
No aditividad	1	0.1854	0.1845	0.063	0.80
Residuos	34	98.624	2.9007		
Interacciones dobles					
Glifosato-% _H					
Glifosato	3	36.738	12.246	4.388	0.01
% _H	1	12.506	12.505	1.081	0.39
Glifosato: % _H	3	3.5667	1.1888	1.144	0.37
Residuos	40	113.89	2.8474		
Glifosato-día					
Glifosato	3	36.738	12.246	4.388	0.01
Día	5	15.090	3.0179	1.081	0.39
Glifosato:día	15	47.912	3.1941	1.144	0.37
Residuos	24	66.967	2.7903		
% _H -día					
% _H	1	12.505	12.505	3.537	0.06
Día	5	15.090	3.0179	0.853	0.52
% _H :día	5	11.851	2.3701	0.670	0.64
Residuos	36	127.26	3.5350		
Efectos simples					
Día					
Día	5	15.096	3.0179	0.836	0.53
Residuos	42	151.62	3.6099		
% _H					
% _H	1	12.505	12.505	3.730	0.05
Residuos	46	154.20	3.3522		
Glifosato					
Glifosato	3	36.738	12.246	4.145	0.01
Residuos	44	129.96	2.9538		

gl: grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: estadístico de Fisher, p: valor p.

Comparación entre las dosis de glifosato con diferencias significativas.

Comparaciones entre glifosato		
50	3.26	a
20	1.69	b
10	1.43	b
0	0.91	b

Interacciones entre los factores glifosato y género y sus efectos simples en el recuento total de los géneros fúngicos más aislados a 70 y 30 %_H.

Géneros fúngicos más aislados 70 % _H					
Interacción doble					
	gl	SC	CM	F	P
No aditividad	1	0.0376	0.0376	0.042	0.84
Residuos	11	9.7736	0.8885		
Efectos simple					
Glifosato					
Glifosato	3	0.2809	0.0936	0.054	0.98
Residuos	16	27.375	1.7109		
Géneros					
Géneros	4	17.564	4.3910	6.526	0.003
Residuos	15	10.092	0.6728		
Géneros fúngicos más aislados 30 % _H					
Interacción doble					
	gl	SC	CM	F	P
No aditividad	1	0.3874	0.3873	0.777	0.39
Residuos	11	5.4835	0.4985		
Efectos simple					
Glifosato					
Glifosato	3	0.7239	0.2412	0.559	0.64
Residuos	16	6.8988	0.4311		
Género					
Género	4	1.0279	0.2569	0.584	0.67
Residuos	15	6.5947	0.4396		

gl: grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: estadístico de Fisher, p: valor p.

Comparación entre los diferentes géneros a 70 %_H con diferencias significativas.

Comparaciones entre géneros		
<i>Aspergillus</i> sp.	3.47	a
<i>Penicillium</i> sp.	3.11	a
<i>Fusarium</i> sp.	1.51	b
<i>Trichoderma</i> sp.	1.37	b
<i>Mucor</i> sp.	1.31	b

Interacciones entre los factores glifosato y cepa/micobiota y sus efectos simples en el recuento de la cepa AM₁ frente a la micobiota nativa por períodos a 30 %_H.

Cepa AM ₁ vs micobiota a 30 % _H por períodos					
Interacción triple					
	gl	SC	CM	F	p
No aditividad	1	0.2126	0.2126	2.876	0.09
Residuos	34	2.5136	0.0739		
Interacciones dobles					
Glifosato-cepa/micobiota					
Glifosato	3	0.5204	0.1734	1.625	0.19
Cepa/Micobiota	1	0.5504	0.5504	5.156	0.02
Glifosato:C/M	3	0.0088	0.0029	0.027	0.99
Residuos	40	4.2696	0.1067		
Glifosato-día					
Glifosato	3	0.5203	0.1734	6.621	0.002
Día	5	1.5432	0.3086	11.78	0.0000078
Glifosato:día	15	2.6568	0.1771	6.761	0.000021
Residuos	24	0.6287	0.0261		
Cepa/micobiota-día					
Cepa/Micobiota	1	0.5504	0.5504	6.118	0.01
Día	5	1.5433	0.3086	3.431	0.01
C/M:día	5	0.0171	0.0034	0.038	0.99
Residuos	36	3.2384	0.0899		
Efecto simple					
Cepa/micobiota					
Cepa/Micobiota	1	0.5504	0.5504	5.276	0.02
Residuos	46	4.7988	0.1043		

gl: grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: estadístico de Fisher, p: valor p.

Comparación entre la cepa AM₁ y la micobiota a 30 %_H con diferencias significativas.

Comparaciones entre cepa/micobiota		
AM ₁	4.83	a
Micobiota	4.62	b

Comparación entre las interacciones glifosato-día a 30 %_H con diferencias significativas.

Comparaciones entre interacción glifosato-día		
10-20	5.90	a
0-20	5.07	b
10-60	4.96	bc
0-50	4.96	bc
0-40	4.85	bcd
0-60	4.83	bcd
50-60	4.81	bcd
50-10	4.80	bcd
0-10	4.79	bcd
20-60	4.78	bcd
20-20	4.70	bcd
10-30	4.68	bcd
50-40	4.62	bcd
0-30	4.60	bcd
20-40	4.60	bcd
50-50	4.60	bcd
10-10	4.59	bcd
20-10	4.54	bcd
20-30	4.51	bcd
50-20	4.51	bcd
20-50	4.46	bcd
50-30	4.39	cd
10-40	4.36	cd
10-50	4.28	d

Interacciones entre los factores glifosato, aw y cepa/micobiota y sus efectos simples en el recuento de la cepa AM₁ frente a la micobiota nativa total y por períodos a 70 %_H.

Cepa AM ₁ vs micobiota a 70 % _H por períodos					
Interacción triple					
No aditividad	1	0.2098	0.2097	2.153	0.15
Residuos	34	3.3116	0.0973		
Interacciones dobles					
Glifosato-cepa/micobiota					
Glifosato	3	0.2776	0.0925	0.544	0.65
Cepa/Micobiota	1	0.2080	0.2080	1.225	0.27
Glifosato:C/M	3	0.1004	0.0334	0.1972	0.89
Residuos	40	6.7917	0.1697		
Glifosato-día					
Glifosato	3	0.2776	0.2080	2.115	0.12
Día	5	3.2704	0.6540	14.95	0.0004
Glifosato:día	15	2.7803	0.1853	4.238	0.0008
Residuos	24	1.0495	0.0437		
Cepa/micobiota-día					
Cepa/Micobiota	1	0.2080	0.2080	2.091	0.15
Día	5	3.2704	0.6540	6.575	0.0004
C/M:día	5	0.3186	0.0637	0.640	0.67
Residuos	36	3.5808	0.0994		
Efecto simple					
Cepa/micobiota					
Cepa/Micobiota	1	0.2080	0.2080	1.334	0.25
Residuos	46	7.1698	0.1558		

gl: grados de libertad; SC, suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: estadístico de Fisher, p: valor p.

Comparación entre las interacciones glifosato-día a 70 %_H con diferencias significativas.

Comparaciones entre interacción Glifosato-día		
10-20	5.12	a
0-20	4.86	ab
20-60	4.78	abc
50-30	4.73	abc
10-10	4.69	abc
50-10	4.69	abc
20-40	4.60	abc
0-40	4.58	abc
0-60	4.57	abc
10-60	4.56	abc
50-60	4.49	abc
20-10	4.47	abc
0-50	4.47	abc
50-20	4.45	abc
0-10	4.45	abc
20-20	4.36	abcd
20-30	4.31	bcd
0-30	4.30	bcd
10-30	4.26	bcd
10-40	4.18	bcd
20-50	4.05	bcd
50-40	3.98	cd
50-50	3.67	de
10-50	4.42	e