
Estudio de las comunidades fúngicas en un suelo del SO bonaerense tratado con glifosato y 2,4-D



María Belén Vázquez

Directora: Dra. María Virginia Bianchinotti

Co-directora: Dra. María Virginia Moreno

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORA EN BIOLOGÍA

**Estudio de las comunidades fúngicas en un suelo del SO bonaerense
tratado con glifosato y 2,4-D**

María Belén Vázquez

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2015

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidas en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre el 12 de Octubre de 2010 y el 28 de Noviembre de 2014, bajo la dirección de la Dra. María Virginia Bianchinotti y la co-dirección de la Dra. María Virginia Moreno. Este escrito incluye cambios y correcciones que fueron sugeridos por los miembros del jurado designado para la evaluación de esta tesis: Dres. Mario Saparrat, Cristina Cordo y María Amelia Cubitto.

María Belén Vázquez



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente Tesis ha sido aprobada el / /, mereciendo la calificación de (.....)

RESUMEN

Los hongos conforman uno de los grupos de organismos más diversos y abundantes que existen sobre la tierra. Junto con otros microorganismos, son los encargados de mediar procesos vitales para el medio ambiente. En el suelo desempeñan un rol central, tanto en el mantenimiento de su estructura como en procesos ecológicos clave como el ciclado de nutrientes y la descomposición de materia orgánica. La composición de la comunidad fúngica del suelo puede variar de un lugar a otro en respuesta a diversos factores. En los suelos agrícolas, los agroquímicos y sus residuos pueden producir cambios en las comunidades fúngicas. Hasta el momento, no se han realizado estudios que analicen de manera integrada el impacto de los herbicidas glifosato y 2,4-D sobre las comunidades fúngicas de suelos agrícolas en el sudoeste de la provincia de Buenos Aires. En esta tesis se investigó el efecto de estos herbicidas sobre las comunidades fúngicas aplicando distintas dosis y combinaciones de glifosato y 2,4-D en parcelas de un suelo de esta región y analizando cambios mediante diferentes metodologías. En el **capítulo 1** se presentan los resultados de la aplicación de una metodología cultivo-dependiente para estimar la biomasa y la composición taxonómica de la comunidad. Se observaron patrones de cambio en la biomasa fúngica entre las parcelas tratadas y el control, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Taxonómicamente, los hongos aislados eran representantes de géneros comunes en los suelos agrícolas y habían sido previamente citados para nuestro país. Los máximos recuentos de levaduras fueron registrados en el tratamiento control, lo cual podría atribuirse a un efecto

inhibidor del glifosato sobre las levaduras del suelo. En el **capítulo 2**, la biomasa fúngica se estimó con una metodología cultivo-independiente (tinción con Calcoflúor). Se encontró que la aplicación de dosis elevadas de glifosato, solo o en combinación con 2,4-D, produjo un estímulo temporal en la biomasa luego de una semana de aplicados los herbicidas. Con la tinción directa con Calcoflúor se detectaron diferencias estadísticamente significativas que no fueron evidenciadas con la técnica cultivo-dependiente. En el **capítulo 3**, las comunidades fueron analizadas utilizando EGGD (electroforesis en geles con gradiente desnaturizante). El nivel de polimorfismo detectado en el análisis de EGGD evidenció que para períodos prolongados de exposición al glifosato en dosis dobles a la recomendada o en combinación con 2,4-D, las comunidades fúngicas del suelo adquirieron una estructura polimórfica característica muy diferente a la de los suelos control o a la de aquellos suelos tratados con la dosis de glifosato recomendada. Según los resultados obtenidos en el presente estudio, no se hallaron cambios evidentes en las comunidades fúngicas de las parcelas tratadas, siendo los atributos estimados similares a los del tratamiento control. Sin embargo, se hallaron evidencias de que en dosis mayores, ya sea solo o en combinación con 2,4-D, la aplicación del glifosato indujo cambios tanto en la biomasa como en la estructura de la comunidad fúngica del suelo.

ABSTRACT

Fungi are among the most abundant and diverse organisms on earth. Together with other microorganisms, fungi are responsible for many important processes in the environment. They play a central role in soils, mainly in the maintenance of soil structure and in ecological processes like nutrient cycling and decomposition of organic matter. Soil fungal community composition may change in response to diverse factors. In agricultural soils, the agrochemicals and their residues can produce changes in fungal communities. The impact of the herbicides glyphosate and 2,4-D on the soil fungal communities has not been studied in agricultural soils from southwestern Buenos Aires province, until now. To assess the effect of these herbicides on the soil fungal communities in the region, soil plots were treated with different doses and combinations of these herbicides, and different methods were used to investigate changes in fungal communities. In **chapter 1**, a culture-dependent technique was used to estimate biomass and taxonomic structure. These results show changes in the fungal biomass between treated and control plots, but these differences were not statistically significant. All the isolated fungal strains were common soil fungi and were previously cited for Argentina. Higher counts of yeast were registered in control samples indicating a potential negative effect of glyphosate on soil yeast. In **chapter 2**, fungal biomass was estimated using a culture-independent technique (Calcofluor stain). A positive short-term effect of glyphosate on soil fungal biomass was observed when doses higher than the recommended or combination with 2,4-D, were applied to soil. Using Calcofluor stain, several significant differences were found between treatments,

compared to culture dependent method. In the **chapter 3**, the communities were analyzed using DGGE (denaturalization gradient gel electrophoresis). The continuous application of glyphosate in doses double than the recommended or in combination with 2,4-D, may cause changes in community structure, compared to control or treated soils with recommended field doses. We conclude that recommended field doses of glyphosate showed no effect on soil fungal communities. However higher doses of glyphosate, as sole herbicide or in combination with 2,4-D, induce changes both on biomass and structure of soil fungal community.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que contribuyeron de una u otra forma al desarrollo de esta tesis.

En primer lugar, un especial agradecimiento a las Dras. María Virginia Bianchinotti y María Virginia Moreno, mis directoras, por la confianza, apoyo y estímulo brindado durante el desarrollo de esta investigación.

En particular mis agradecimientos para todo el equipo de trabajo del LEBBAH por compartir del día a día y por hacer más ameno el desarrollo del trabajo. Naty, Romi, Guada, Mel, Pao, Lucas, Cone, Vir, las Cecis, Patricia, Ricky, Jorge y a todos los que en algún momento pasaron por el laboratorio.

Al BIOLAB por permitir realizar parte de esta tesis con su grupo de investigación en la Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Gracias a todos por recibirme, enseñarme y permitirme ser por un tiempo una más en su equipo de trabajo. Vir, Sebastián, Luciana, Inés y los técnicos, muchas gracias por hacer que el tiempo fuera de mi ciudad sea tan cálido.

Al Dr. Jaap Bloem, por ayudarme con parte de las metodologías aplicadas en esta tesis y a su vez por abrirme las puertas de su laboratorio e invitarme a realizar una estadía en el mismo, espero poder concretar la visita pronto.

Al Instituto Argentino de Oceanografía (IADO), por permitirme utilizar la sala de microscopía cada vez que fue necesario.

También le quiero agradecer a Susana (la mamá de Virginia Moreno), que me alojó en su casa durante mi estadía en la ciudad de Azul y me trató como a una hija.

Agradezco a mi familia, mamá, papá, Gastón y el Peque, por apoyarme y alentarme a seguir en esto que un día elegí sin estar muy convencida y hoy es parte de mi vida.

A mi familia política los Amodeo, por aceptarme e integrarme a sus vidas y por interesarse y colaborar con mi trabajo cada uno desde el lugar que puede.

A mis amigos los Biólogos, los Acróbatas, los Músicos, gracias a todos por escucharme una y mil veces las frases “trabajo con hongos que comen herbicidas...” o “no puedo, estoy escribiendo...”

No quiero dejar pasar la oportunidad para nombrar a mi hijita canina “Claque”, que me despierta todas las mañanas y no para de interrumpir en cada momento de concentración y escritura con algún juguete.

También le quiero agradecer muy especialmente a Pepi, por compartir su vida conmigo, por quererme y aceptarme como soy y por su ayuda y apoyo incondicional.

*“Es una locura odiar a todas las rosas porque una te pinchó,
Y renunciar a todos tus sueños porque una de ellos no se realizó”*

- El Principito -

INDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	5
AGRADECIMIENTOS	7
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	19
Objetivos específicos.....	19
Hipótesis previas a la investigación	20
CAPITULO 1	21
Introducción	21
Materiales y Métodos	26
Área de estudio	26
Diseño experimental	28
Cronograma de aplicación de herbicidas y toma de muestras	28
Procesamiento de las muestras	29
Soluciones y Medios de Cultivo	33
Análisis estadístico	34
Resultados.....	35
Discusión	49
CAPITULO 2	56
Introducción.....	56
Materiales y Métodos	60
Preparación de los frotis de suelo	60
Soluciones fluorescentes.....	60
Tinción de los frotis de suelo.....	61
Observación de los frotis y recuento.....	62
Cálculos y estimaciones.....	63
Análisis estadístico	65
Resultados.....	66
Discusión	77
CAPITULO 3	82

Introducción	82
Materiales y Métodos	91
Extracción del ADN	91
Análisis de calidad y cuantificación del ADN extraído	93
Soluciones	93
Amplificación del ADN extraído.....	96
Electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (EGGD)	99
Resultados	103
Discusión	118
CONSIDERACIONES FINALES.....	124
ANEXO 1: Preparación, siembra, corrida y tinción de geles para EGGD	126
BIBLIOGRAFÍA.....	135

INTRODUCCIÓN GENERAL

El suelo se define geológicamente como la capa superior de la corteza terrestre donde se combinan materia mineral y orgánica, agua y aire (Tarbuck, et al., 2005). Constituye la interfase entre la tierra (geosfera), el aire (atmósfera) y el agua (hidrosfera), y está compuesto de partículas minerales (45 %), materia orgánica (6,3 %), organismos vivos (0,7 %), agua (23 %) y aire (25 %). Su formación resulta de la alteración superficial del material geológico subyacente por la acción combinada del clima y de los organismos vivos a lo largo de extensos períodos de tiempo, bajo condiciones diversas de topografía o relieve local (Wilding et al., 1983). Los suelos son un medio heterogéneo y dinámico, con propiedades químicas, físicas y biológicas variables incluso a escalas espaciales muy pequeñas, que dificultan su estudio (Yaron et al., 1996). A medida que se ha ido tomando conciencia de su progresiva degradación, han surgido conceptos como “calidad” y “salud” del suelo. Según Carter et al. (1997) la “calidad” de un suelo es el grado de aptitud del mismo para desempeñar una función determinada, por lo tanto ésta puede variar cuando se pretende darle un uso diferente. Por el contrario, el término “salud” incorpora aquellas características o atributos ecológicos que tienen implicaciones más allá de su calidad o capacidad para cumplir una determinada función. Esas características son las que están estrechamente relacionadas con la biota del suelo, la biodiversidad, la actividad, la estructura de la red trófica, etc. La resiliencia del suelo, es su capacidad para recuperarse en respuesta a las perturbaciones naturales o antropogénicas. Esta recuperación puede verse reducida de manera significativa si la composición de

organismos que viven en el suelo se altera. En los últimos años, especialmente a partir de la incorporación del concepto salud del suelo, existe un enorme interés por estudiar diferentes propiedades del suelo para ser utilizadas como potenciales indicadores de “calidad” o “salud” del mismo. Entre estos, los indicadores biológicos presentan varias ventajas sobre los químicos o físicos, entre las que se destacan: (i) su carácter integrador de la totalidad de las propiedades físicas, químicas y biológicas que definen el ecosistema suelo en el tiempo y en el espacio; y (ii) su capacidad para responder con gran sensibilidad y rapidez a los cambios y perturbaciones introducidas en ese ecosistema. El seguimiento de cambios en los indicadores biológicos puede utilizarse como señal de alarma ante una posible perturbación severa del sistema, de forma que los gestores y agricultores puedan reaccionar con la antelación requerida antes de que se originen modificaciones irreversibles (Pankhurst, 1997).

La comunidad biológica del suelo está integrada por una variedad de organismos que comprende desde pequeños mamíferos, artrópodos y gusanos, hasta hongos y bacterias, entre otros (Madigan et al., 2009). Muchos estudios enfocados a la búsqueda de potenciales indicadores biológicos de disturbios en este ambiente (Pankhurst et al., 1997; Arshad y Martin, 2002; Nielsen y Winding, 2002; Markert et al., 2003) han concluido que los microorganismos son especialmente valiosos como indicadores biológicos en este ecosistema.

Entre la microbiota, los hongos son reconocidos por su alta diversidad, y en el suelo son uno de los componentes más importantes de la misma (Buscot y Varma, 2005). Omnipresentes, casi siempre superan en biomasa a las bacterias,

salvo en la rizósfera (Hawksworth et al., 1995). Los hongos intervienen en casi todos los procesos biológicos que ocurren en el suelo y cumplen un rol relevante en la formación de agregados estables y en el mantenimiento de la estructura del suelo (Beare et al., 1997; Miller y Jastrow, 2000; Rillig et al., 2002; Heredia Abarca et al., 2004). La composición fúngica del suelo puede variar en relación con la ubicación geográfica, clima, vegetación y también con los atributos fisicoquímicos del suelo como el contenido de materia orgánica, humedad, aireación, pH, temperatura (Hawksworth et al., 1995; Tuomela et al., 2002).

El principal objetivo de un sistema agrícola sustentable es que mantenga la productividad y sea útil a la sociedad indefinidamente (Altieri, 1999). Esto implica que esos sistemas deben ser económicamente competitivos y rentables y al mismo tiempo deben conservar los recursos productivos preservando el medio ambiente, en respuesta a los requerimientos sociales (Ferrari, 2010). Altieri (1999) considera que el aumento de la biodiversidad microbiana en los suelos es una estrategia ecológica clave en el funcionamiento de los agro-ecosistemas, ya que los microorganismos son un nexo importante en las relaciones suelo-planta-herbicida-fauna-hombre. La agricultura moderna se apoya fuertemente en el uso de agroquímicos para el control de malezas y plagas, con el fin de obtener mejoras económicas aumentando la productividad para una población mundial en aumento (Zabaloy et al., 2012). Por un lado los herbicidas introducen beneficios obvios como el aumento del rendimiento de los cultivos por el control de las malezas (Cooper, 2007); pero los efectos indeseados, directos o indirectos, y su

destino final en el ambiente es un motivo de preocupación en los últimos tiempos (Pimentel, 1995).

Se ha corroborado que las comunidades fúngicas son alteradas por las actividades agrícolas (Frey et al., 1999; Arshad y Martin, 2002; Qin et al., 2014). Los agroquímicos y sus residuos producen cambios importantes en estas comunidades (Chakravarty y Chatarpaul, 1990; Busse et al., 2001; Ratcliff et al., 2006; Zabaloy et al., 2008). Entre los herbicidas más utilizados a nivel mundial se encuentran el glifosato (N-fosfometil-glicina) y el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Mendelson, 1998). La difusión masiva de ambos originó la propagación de malezas tolerantes o que desarrollaron estrategias de "escape", derivando en el incremento de las dosis empleadas, aplicaciones repetidas y/o incorporación en las mezcla de otros principios activos. El tiempo de degradación del 50 % del compuesto de origen (DT50) es de 30 a 174 días para el glifosato y de menos de 7 días para 2,4-D, y se ha encontrado que estos herbicidas tienen efectos tóxicos directos sobre los microorganismos (Zabaloy et al., 2008).

En Argentina, 160.000 toneladas de glifosato son aplicadas anualmente para controlar malezas en diferentes cultivos (CONICET, 2009). La dosis recomendada varía entre 2 y 4 l/Ha, pero mayores dosis o aplicaciones repetidas son comunes (Cerdeira y Duke, 2006; Lupwayi et al., 2009). El glifosato ha sido considerado tradicionalmente un herbicida "seguro", con poco impacto sobre las comunidades fúngicas. A pesar de que su toxicidad ha sido demostrada en experimentos en medios sintéticos, en los cuales los hongos fueron eliminados con dosis significativamente menores que las necesarias para suprimir a bacterias

(Busse et al., 2001), pocos cambios han sido observados en suelos luego de la aplicación de dosis recomendadas del herbicida (Ratcliff et al., 2006). Sin embargo, la información es conflictiva, ya que estudios recientes señalan que el herbicida induce cambios profundos sobre las comunidades fúngicas, inhibiendo el desarrollo de algunos hongos y favoreciendo el crecimiento de otros menos deseables, como algunos patógenos (Johal y Huber, 2009). Krzyśko-Lupicka y Sudol (2008), usando un método cultivo-dependiente, observaron que luego del tratamiento con el herbicida, existía una tendencia hacia la selección de especies autóctonas de *Fusarium*, confirmando observaciones previas como las de Meriles et al. (2006) y Means et al. (2007). Esta alteración ha sido relacionada con cambios en las poblaciones microbianas que modifican el equilibrio y tienen como resultado último una disminución de la diversidad, por ejemplo, la disminución de las poblaciones de bacterias antagonistas de los hongos patógenos (Kremer y Means, 2009).

Los hongos son reconocidos por su extraordinaria capacidad para degradar/mineralizar una gran variedad de sustancias consideradas contaminantes ambientales (Reddy, 1995). La investigación de la degradación fúngica de fosfonatos comenzó a principio de los años 90 (Singh y Walker, 2006). Krzyśko-Lupicka y Orly (1997) fueron los primeros en usar al glifosato como agente de selección para el aislamiento de hongos de suelo. Ellos notaron que en un medio con glifosato la diversidad específica disminuía fuertemente, con un aumento de la predominancia de especies de *Mucor*, *Fusarium* y *Trichoderma*. Casi todas las especies tolerantes crecían bien con glifosato como única fuente de

P, pero pocas podían hacerlo cuando éste era la única fuente de C. Klimek et al. (2001) y Lipok et al. (2003) demostraron que *Penicillium chrysogenum* puede usarlo como fuente de N. Romero et al. (2004) trabajando con suelos de la Argentina tratados con glifosato, aislaron levaduras y demostraron por primera vez la capacidad de algunas para crecer con glifosato como única fuente de C. Krzyśko-Lupicka et al. (1997), Castro Jr. et al. (2007); Pizzul et al. (2009) estudiaron la biodegradación fúngica del glifosato y mencionan la capacidad de distintas especies de hongos (i.e. *Aspergillus niger*, *Fusarium spp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma spp.*).

En cuanto al 2,4-D, los registros acerca de su degradación mediada por hongos y de los posibles efectos de su aplicación sobre las comunidades fúngicas no son tan abundantes (Zabaloy et al., 2011). Donnelly et al. (1993) estudiaron la capacidad de varios hongos ectomicorrízicos para degradar 2,4-D, encontrando que solo *Phanerochaete chrysosporium* (Basidiomycota) podía hacerlo pero dependiendo de fuentes externas de nitrógeno. Vroumsia et al. (2005) realizando estudios *in vitro* mencionan la capacidad de distintas cepas de hongos filamentosos para degradar el herbicida en medio líquido. Silva et al. (2007) aislaron, a partir de suelos brasileros contaminados con 2,4-D una cepa de *Penicillium* capaz de degradar el herbicida *in vitro*.

El estudio de los hongos del suelo es complejo y puede ser abordado aplicando distintas metodologías y técnicas. Básicamente esta complejidad radica en que las técnicas convencionales basadas en el uso de medios de cultivo son consideradas insuficientes para un análisis exhaustivo de muestras

medioambientales. Muchos hongos son incapaces de crecer – solo una pequeña fracción (menos del 1%) es cultivable en laboratorio (Amann et al., 1995) – o de desarrollar estructuras reproductivas en condiciones de laboratorio, limitándose de esta manera la información obtenida para llevar a cabo una determinación taxonómica tradicional. Por ello se han desarrollado técnicas independientes del cultivo. Algunas fueron diseñadas para detectar su presencia, contarlos y así estimar su biomasa. Otras fueron diseñadas para cuantificar la actividad fúngica a partir de medidas como la respiración, perfil fisiológico por utilización de sustratos o su actividad enzimática (Alef y Nannipieri, 1995). En las últimas décadas, las técnicas moleculares se han perfeccionado, estas herramientas son útiles en estudios de identificación de especies, produciendo resultados muy interesantes en la interpretación de problemas evolutivos, taxonómicos y de distribución específica. Una metodología muy utilizada para la identificación genética de diversos microorganismos involucra a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores “universales” diseñados para estos microorganismos (zonas conservadas del ADNr) (Viaud et al., 2000; Bougoure et al., 2005). Esta metodología puede ser complementada con la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (EGGD). Esta consiste en la separación de productos de amplificación obtenidos por PCR de pequeños fragmentos de ADN de doble cadena dependiendo de su punto de desnaturización, siendo dicha desnaturización definida en este caso como la separación de cadenas complementarias de ADN (Muyzer et al., 1993). De esta manera, es posible estimar abundancias de grupos particulares, dependiendo de la especificidad de

los cebadores seleccionados (de Souza et al., 2004; Zhu et al., 2005; Marie et al., 2006).

En la Argentina se han realizado numerosos estudios de diversidad fúngica en suelos. En particular, para la provincia de Buenos Aires, en suelos prístinos pueden mencionarse los de Cabello, (1985, 1986), Cabello y Arambarri (2002), Allegrucci et al. (2007, 2009) y Elíades et al., (2009). Con respecto a la diversidad en suelos agrícolas, pueden mencionarse diversos trabajos (Aon et al., 2001; Mendez et al., 2001; Lugo y Cabello, 2002; Nesci et al., 2006; Meriles et al., 2006; Irrazabal et al., 2005; Lori et al., 2009; Moreno et al., 2011; Bórtoli et al., 2012; Moreno et al., 2013; Silvestro et al., 2013; Velázquez et al., 2013; Vázquez et al., 2014). En cuanto a los cambios inducidos en las comunidades fúngicas por la aplicación de herbicidas, estos fueron estudiados por Aon et al. (2001) y Gaspar et al. (2001) en la región centro-este de la provincia de Buenos Aires, y recientemente, Bórtoli et al. (2012) corroboraron el impacto negativo del glifosato en suelos sin historia de aplicación del herbicida en la provincia de Córdoba.

El sudoeste de la provincia de Buenos Aires ha sido, históricamente, una región agrícola ganadera, para pasar en los últimos años a ser una región casi exclusivamente agrícola (Studdert, 2000; Rozas et al., 2011). Hace algunas décadas se inició la siembra de cultivos genéticamente modificados y esto resultó en un continuo aumento del uso de agroquímicos (Zabaloy, 2008), siendo el glifosato y el 2,4-D los herbicidas más usados en la región.

El impacto que la aplicación de herbicidas tiene sobre las comunidades fúngicas del suelo en el sudoeste bonaerense aún no ha sido investigado.

OBJETIVO GENERAL

Investigar los cambios producidos en la comunidad fúngica de un suelo de la región SO de la provincia de Buenos Aires por la aplicación de dos herbicidas, glifosato y 2,4-D.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar hongos de suelos tratados con distintas dosis y combinaciones de glifosato y 2,4-D.
- Estimar la biomasa fúngica utilizando una metodología cultivo dependiente.
- Estimar la biomasa fúngica utilizando una metodología cultivo independiente.
directa
- Realizar los perfiles moleculares de las muestras de suelo utilizando PCR acoplado a electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (EGGD).
- Realizar el análisis de agrupamiento de los perfiles moleculares obtenidos

Hipótesis previas a la investigación

- La introducción de sustancias químicas de origen antrópico (como los herbicidas) en el suelo afecta la dinámica de la comunidad de microorganismos que en él habitan.
- La biomasa fúngica es un parámetro sensible, que permite detectar cambios provocados por la aplicación de herbicidas y puede ser utilizado como un índice biológico de la calidad de suelo.
- Las técnicas cultivo-independientes son más sensibles para detectar cambios en la biomasa fúngica.
- Los perfiles moleculares de las comunidades fúngicas de un suelo tratados con herbicidas difieren con respecto a los obtenidos en un suelo sin tratar.
- La exposición prolongada a un xenobiótico genera cambios en la estructura taxonómica de las comunidades fúngicas del suelo.

CAPITULO 1

Estimación de la biomasa y la composición taxonómica fúngica utilizando un método cultivo-dependiente.

Introducción

En el suelo los microorganismos desempeñan un importante papel en relación a la calidad y productividad, Doran y Parkin (1994) sostienen que existe una clara relación entre las características microbiológicas y la salud del suelo. Las investigaciones microbiológicas en el suelo generalmente enfocan su estudio a nivel de procesos (Hill et al., 2000); los parámetros comúnmente evaluados son biomasa, tasa de respiración y actividad enzimática. El análisis de los cambios registrados en estos parámetros ayuda a comprender el funcionamiento de los procesos microbiológicos y el rol de los microorganismos en la salud y calidad del suelo. La biota fúngica es una de las más diversas que existe sobre la Tierra (Blackwell, 2011) y en el suelo, la diversidad fúngica es amplia tanto desde el punto de vista fenotípico como genético y funcional. Muchas investigaciones han centrado su atención en el estudio de la diversidad de los hongos del suelo, con el objetivo de comprender mejor el funcionamiento del suelo como un ecosistema (Cabello, 1985; Hill et al., 2000; Hawksworth, 2001; Anderson y Cairney, 2004; Jeewon y Hyde, 2007).

Tradicionalmente los métodos empleados en el estudio de la diversidad y biomasa de microorganismos del suelo se basan en la aplicación de técnicas que implican su cultivo (Alef y Nannipieri, 1995). Las metodologías cultivo-

dependientes tienen la ventaja de ser fácilmente aplicables y de bajo costo, en comparación con otras. Para analizar la diversidad de hongos en suelos, estos métodos acoplados con descripciones morfológicas son la primera elección (Jeewon y Hyde, 2007). Entre las metodologías tradicionales, la técnicas de diluciones seriadas de suelo (Warcup, 1950) junto con la técnica de siembra y lavado de partículas (Parkinson y Williams, 1960) son muy usadas a para el aislamiento y caracterización de las comunidades fúngicas del suelo (Kurek et al., 2007; Adawiah, 2008; Gaddeyya et al., 2012; Nandhini y Josephine, 2013).

Algunos hongos son más fácilmente cultivables que otros y, aún existen otros que nunca se han podido cultivar en medios artificiales. Los hongos generalistas (i.e. *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp.) son capaces de crecer sobre varios medios de cultivo sintéticos, razón por la cual son frecuentemente recuperados a partir de muestras de suelo (Bridge y Spooner, 2001; Jeewon y Hyde, 2007).

La biomasa microbiana del suelo representa la fracción responsable del ciclado de energía y nutrientes, es fundamental para que ocurran esos procesos, y por eso su cuantificación da una idea del estado y funcionamiento del mismo (Visser y Parkinson, 1992). Numerosos estudios han registrado una estrecha relación entre biomasa microbiana, tasa de descomposición de la materia orgánica y ciclado de nutrientes como C, N, P, S y diversos micronutrientes (Jenkinson, 1990; Smith y Paul, 1990; Carter et al., 1997; Stevenson y Cole, 1999). La mayoría de los trabajos se refieren a biomasa microbiana total o simplemente biomasa bacteriana, sin diferenciar la fracción fúngica (Hill et al., 2000; Ibekwe et al., 2001;

Zabaloy et al., 2009; Cui et al., 2014). Si bien en los últimos años han aumentado los trabajos enfocados al estudio de la biomasa fúngica, históricamente los hongos de suelo han sido menos estudiados que las bacterias (Paul y Harris, 1999; Hill et al., 2000; Ibekwe et al., 2001; Söderberg et al., 2004; Zabaloy et al., 2008; Gómez et al., 2009; Vargas Gil et al., 2011).

En suelos agrícolas es muy importante entender el funcionamiento de las comunidades fúngicas ya que la productividad del suelo se ve afectada en parte por la estructura del mismo, el contenido de materia orgánica y la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento y desarrollo vegetal. La biomasa fúngica contribuye particularmente a la estabilización y mantenimiento de la estructura del suelo y puede ser utilizada como un indicador del contenido de carbono orgánico del suelo (Smith y Paul, 1990; Carter et al., 1997; Fießbach y Mäder, 2000).

La aplicación de agroquímicos puede tener efectos perjudiciales sobre los microorganismos del suelo. El estudio de los efectos de la aplicación de herbicidas sobre las comunidades microbianas y sobre los procesos que los microorganismos desempeñan en el suelo, es relevante para detectar cambios que disminuyan la calidad del suelo. Los estudios son aún escasos para establecer con absoluta certeza si los agroquímicos son nocivos o no para las comunidades de microorganismos del suelo, y en particular para los hongos.

La biodegradación de pesticidas mediada por microorganismos es una de las vías principales para la detoxificación de los suelos (Van Eerd et al., 2009). Los hongos poseen una amplia diversidad metabólica que les permite utilizar una gran

variedad de sustancias consideradas contaminantes ambientales, siendo así interesantes candidatos para la recuperación de áreas contaminadas (Reddy, 1995).

La biodegradación fúngica de herbicidas puede formar parte de un proceso asimilativo o bien puede ser producto de un proceso co-metabólico (Donnelly et al., 1993; Krzysko-Lupicka et al., 2008). El glifosato ha recibido especial atención debido a su uso masivo, aunque también hay estudios sobre biodegradación de otros herbicidas entre que se puede mencionar al metsulfuron metilo, la atrazina y 2,4-D. El glifosato contiene C, P y N, y puede ser utilizado por los hongos como fuente de energía y también como nutriente (Krzysko-Lupicka y Orlik, 1997; Krzysko-Lupicka et al., 1997; Romero et al., 2004; Castro Jr. et al., 2007; Pizzul et al., 2009). La biodegradación fúngica del glifosato puede dar como productos AMPA o sarcosina, dependiendo de la vía enzimática utilizada, pero el primero es el más común (Krzysko-Lupicka et al., 2008). Si bien la biodegradación de 2,4-D ha sido menos estudiada, se sabe que el mismo puede ser utilizado por algunas cepas de hongos en condiciones co-metabólicas (Donnelly et al., 1993). La biodegradación microbiana es probablemente la principal vía de descomposición de este herbicida en suelos (Walters, 1999).

En la Argentina los herbicidas más empleados son el glifosato y el 2,4-D. El impacto del primero sobre la biomasa fúngica ha sido previamente estudiado en algunos sitios de las provincia de Córdoba (Meriles et al., 2006; Bórtoli et al., 2012). Con respecto al 2,4-D, Merini et al. (2007) y Zabaloy et al. (2008) evaluaron en microcosmos su impacto sobre la biomasa microbiana. En la provincia de

Buenos Aires, Aon y Colaneri (2001) y Aon et al. (2001) estudiaron los cambios en variables microbiológicas de suelos bajo distintos sistemas de labranza, tratados con glifosato solo o en combinación con 2,4-D. Sin embargo, no hay registros de estudios en la región semiárida sobre el efecto de la aplicación combinada de ambos herbicidas sobre las comunidades fúngicas. En este contexto, el objetivo general del presente capítulo fue analizar, en un suelo de una región agrícola del SO bonaerense, el impacto de la aplicación de diferentes dosis y combinaciones de dos herbicidas (glifosato y 2,4-D) sobre la biomasa y estructura de la comunidad fúngica aplicando una metodología cultivo-dependiente clásica.

Materiales y Métodos

Área de estudio

Las parcelas se ubicaron en la estación experimental “Colonia Napostá”, perteneciente a la Universidad Nacional del Sur, ubicada sobre la ruta Nacional 33, kilómetro 35 (38°29’56” S; 62° 17’36” O) Figura 1. El área se encuentra dentro de la región semiárida Pampeana. En esta zona predominan los suelos Haplustoles típicos, caracterizados por su bajo contenido de materia orgánica < 2% (Panigatti, 2010). El clima es semiárido templado, con sequías frecuentes y lluvias esporádicas, con una temperatura media anual de 15 °C y vientos promedio que superan los 20 km/hora. La concentración de lluvias en el sudoeste de Buenos Aires y sudeste de La Pampa, se produce durante dos estaciones bien definidas, otoño y primavera; una estación seca a fines del invierno (Agosto a Septiembre) y otra semi-seca a mediados de verano (Enero a Febrero) con alta evapotranspiración. La región se encuentra dentro de los límites de la isohieta anual de 500 mm.

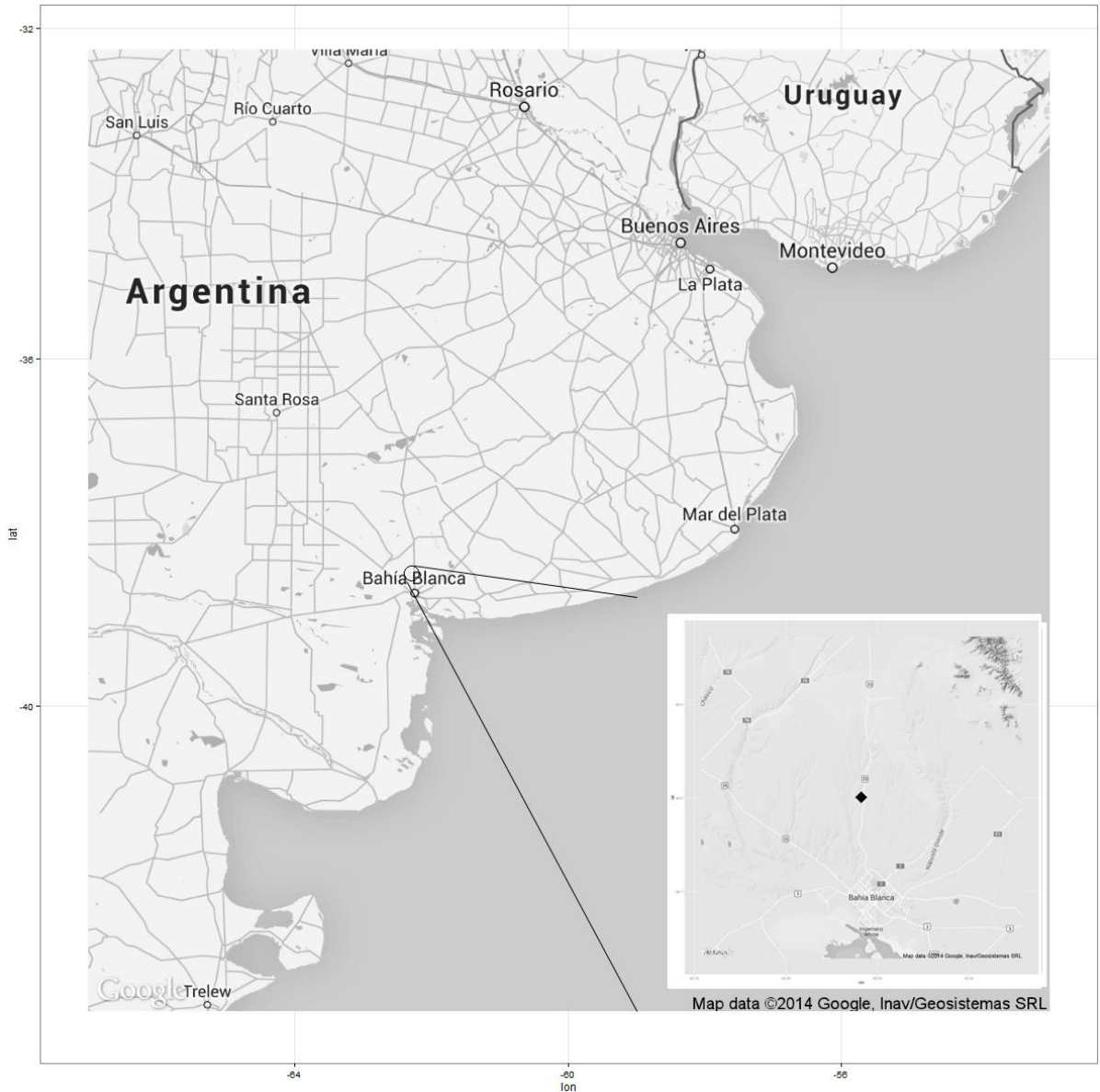


Figura 1: Mapa de la provincia de Buenos Aires. El símbolo "■" marca el área de estudio.

La información meteorológica fue provista por el Lic. Carlos Zotelo, meteorólogo del CERZOS-CCT Bahía Blanca. Los datos meteorológicos utilizados fueron temperatura (máximas y mínimas diarias), y valores de precipitación.

Diseño experimental

Fue diagramado por la Dra. Celina Zabaloy para el proyecto PICT-IIA-2007 (en el marco del cual se realizó esta tesis). El área de trabajo había sido desmalezada con cortadora mecánica y el grueso del material vegetal removido a mano. En la parcela estaban delimitadas 20 sub-parcelas de 2,25 m largo y 1,60 m de ancho (Sup. aprox. 3,60 m²), dispuestas con un diseño en bloques aleatorizados con cuatro réplicas por tratamiento; dichos tratamientos fueron: A: Control (2 l de agua); B: glifosato 1x (2,5 l Ha⁻¹); C: glifosato 2x; D: glifosato 1x + 2,4-D 1x (400 ml Ha⁻¹); E: glifosato 2x + 2,4-D 1x. Los herbicidas empleados fueron productos comerciales: Glifosato Atanor S.A. (sal amina 48%, N-fosfonometil-glicina, principio activo: C₃H₈NO₅P) y 2,4-D Atanor S.A. (éster butílico del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, principio activo: C₆H₃Cl₂OCH₂CO₂C₄H₉). Los herbicidas se prepararon *in situ* para su aplicación inmediata, calculando la dosis proporcional a la superficie de la parcela, y disolviendo el/los producto/s en 2 litros de agua. La pulverización se realizó con mochila equipada con un pico de pastilla de tipo abanico plano, cuidando de no dispersar producto en las parcelas contiguas y obtener la aspersion deseada en cada una (Zabaloy, com. pers.).

Cronograma de aplicación de herbicidas y toma de muestras

Las muestras se tomaron durante dos años consecutivos, a los 2, 5, 13 y 26 días posteriores al tratamiento (a partir de 11/06/10), y a los 2, 7, 21 y 45 días (a partir de 3/05/11).

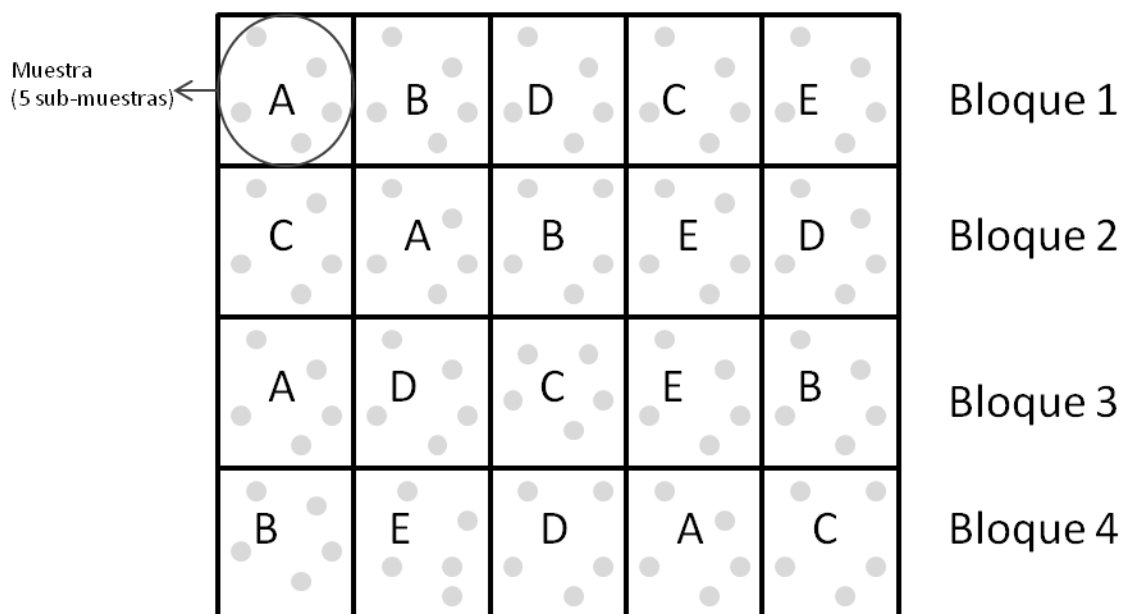


Figura 2: Esquema del diseño experimental y de la toma de muestras en cada parcela. A: control; B: Glifosato 1x; C: Glifosato 2x; D: Glifosato 1x +2,4-D 1x; E: Glifosato 2x+ 2,4-D 1x.

Las muestras fueron tomadas del perfil superior del suelo (0-10 cm profundidad), con la ayuda de un muestreador de suelos con pico y tacho. Se tomaron 5 sub-muestras de cada parcela y se mezclaron para obtener una muestra de aproximadamente 100 g por parcela (Figura 2). Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno estériles y se mantuvieron refrigeradas a 4 °C, y en oscuridad hasta su procesamiento, para evitar los efectos del almacenamiento sobre la comunidad microbiana (Paul, 2006). Luego de utilizar parte de la muestra para los análisis microbiológicos clásicos, las muestras se congelaron a -20 °C, para ser utilizadas posteriormente en los estudios cultivo-independientes y en la extracción de ADN total.

Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron procesadas dentro de las 24 horas posteriores al muestreo. Para realizar aislamientos y estimar el número de unidades formadoras de colonias presentes por gramo de suelo (UFC/g suelo) se utilizó la técnica de recuento en placa (Lorch et al., 1995). De cada muestra de suelo se tomaron 10 g que se suspendieron en 90 ml de solución salina estéril, esta suspensión (1:10) se homogeneizó en vórtex durante 30 segundos. A partir de ella se realizaron diluciones seriadas. Se sembraron la 3^{ra} (1:1000) y la 4^{ta} (1:10000) dilución, ya que en cada placa en número de UFC debe ser entre 20 y 100, para que los conteos sean correctos (Lorch et al., 1995; Söderberg et al., 2004).

Se emplearon dos medios de cultivo 1) agar malta (AM) para realizar los aislamientos para la estimación de la variabilidad fenotípica y 2) un medio con antibiótico (cloranfenicol) y Rosa de Bengala para realizar los recuentos de UFC/g en placa (APGBRC). En cada placa, se sembró por extensión en superficie 0,1 ml de suspensión de suelo, se dispersó con espátula de Drigralsky previamente esterilizada. Se sembraron placas con las 3^{ra} y 4^{ta} diluciones, por triplicado en los dos medios de cultivo y las mismas se incubaron 14 días a 25 °C. Las cajas fueron controladas periódicamente a los 7, 10 y 14 días y el número final de UFC por placa fue el registrado a los 14 días de cultivo. Se registraron el número de UFC, discriminando el número de UFC de hongos filamentosos del número de UFC de levaduras. Para cada muestra se sembraron, en total, 12 placas (Figura 3). Los valores de UFC/g suelo se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g suelo} = P \times F_s \times F_d$$

Donde P: número promedio de UFC (entre las tres réplicas sembradas), Fs: Factor de siembra, y Fd: factor de dilución.

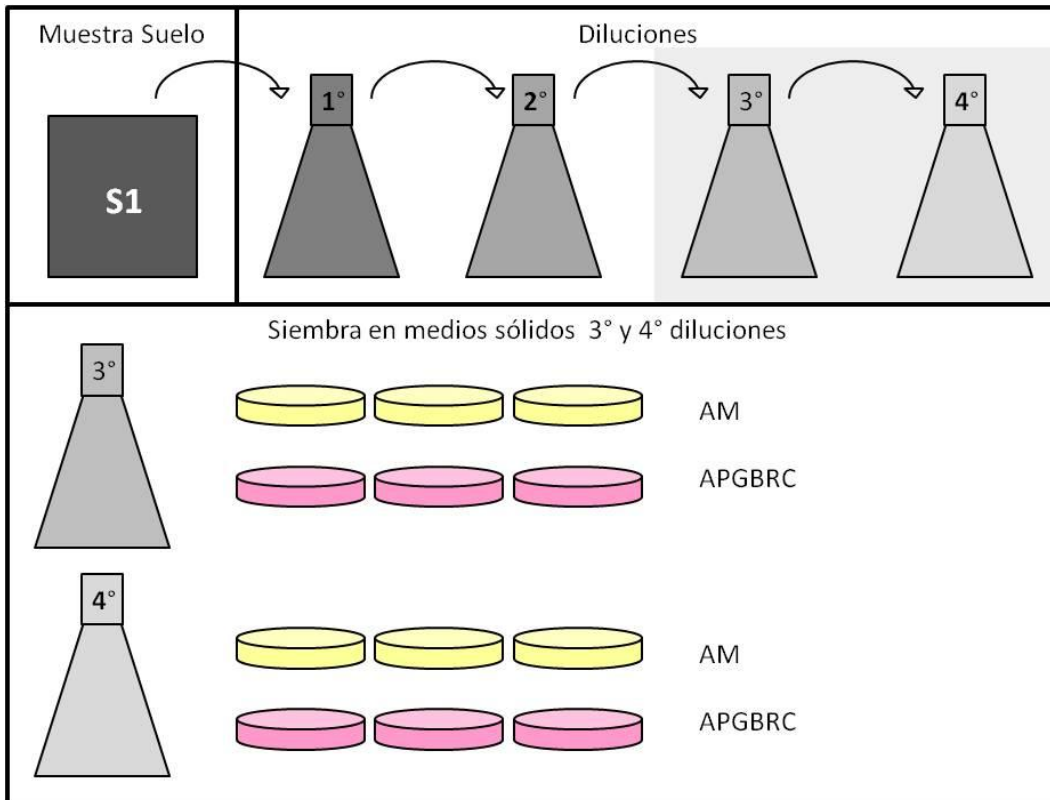


Figura 3: Procesamiento de las muestras. Diluciones seriadas y siembra en medios de cultivo sólidos AM (Agar-Malta) y APGBRC (Agar, Peptona, Glucosa, Rosa de bengala, Cloranfenicol).

Para calcular la biomasa se siguió a Stevenson (1986):

$$Biomasa\ fúngica = N^{\circ}\ UFC \times volumen \times densidad$$

Donde, el volumen y la densidad fúngica son parámetros tomados de la bibliografía. Volumen de hifas por gramo de suelo está dado por un ancho

promedio de 2,5 μm y una longitud promedio de 10 m por gramos de suelo (Alexander, 1978). La densidad de referencia utilizada fue 1,2 g / cm^3 (Paul, 2006).

Una vez sembradas las placas de Petri, todas las diluciones de suelo fueron fijadas con Formol 40 % (formalina). Previamente se homogenizaron en vórtex durante 2 minutos, luego una alícuota de 5 ml se transfirió a tubos de hemólisis a los que se les agregó 0,1 ml de formalina. Las muestras fijadas se conservaron a 2 °C en oscuridad, para ser utilizadas posteriormente.

Sólo se intentó el aislamiento de los hongos filamentosos. Todas las colonias filamentosas que crecieron tanto en APGBRC como en AM, fueron transferidas a tubos de ensayo con AM. Los tubos fueron llevados a cámara de cultivo 14 días a 25 °C, o hasta observarse crecimiento y/o esporulación abundante, luego se almacenaron a 4 °C. Los tubos se organizaron en grupos según sus características morfológicas macroscópicas (color, aspecto). Para la determinación específica, los aislamientos fueron nuevamente repicadas a placas de Petri con los medios de cultivo recomendados para su identificación (ver soluciones y medios de cultivo). Se registraron los caracteres macro morfológicos (diámetro a los 5 días, forma, márgenes, elevación, superficie, densidad, presencia de pigmentos, color), siguiendo a Domsch et al. (1993) y Watanabe (2002). Se determinaron específicamente todas las colonias aisladas que esporularon en los medios y condiciones de laboratorio empleadas. Una vez determinadas, las colonias se transfirieron a tubos con medios adecuados para su conservación en el cepario del LEBBAH (CERZOS-CCT Bahía Blanca).

Soluciones y Medios de Cultivo

- Solución salina estéril. Esterilizar 20 minutos a 121 °C, conservar a 2 °C.

MgSO ₄ (H ₂ O) ₇	0,4 g
FeSO ₄ (H ₂ O) ₇	0,02 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
SO ₄ (NH ₄) ₂	0,2 g
CaSO ₄	0,08 g
H ₂ O _{dest}	1000 ml

- Agar Malta (AM), pH 5,5-6, Esterilizar 20 minutos a 121 °C, conservar a 2 °C.

Agar-Agar	20 g
Extracto malta	10 g
H ₂ O _{dest}	1000 ml

- Agar Papa Glucosado (APG), pH 6,9-7, Esterilizar 15 minutos a 121 °C, conservar a 2 °C.

Agar Papa Glucosado (Britania®)	39 g
H ₂ O _{dest}	1000 ml

- Agar Rosa de Bengala – Cloranfenicol (APGBRC), pH 7-7,2, Esterilizar 20 minutos a 121 °C, conservar a 2 °C.

Agar – Agar	20 g
Peptona	10 g

Glucosa	40 g
Rosa Bengala	66 mg
Cloranfenicol	0,1 g
H ₂ O _{dest}	1000 ml

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un análisis de la varianza en bloques al azar. Se incorporaron al análisis las variables ambientales, se calcularon las precipitaciones acumuladas durante los 7 días previos a cada muestreo. También se calculó el promedio de las temperaturas de los 7 días previos a los muestreos. Para los cálculos y gráficos se utilizaron los paquetes *stats* (R-Core-Team, 2012), *gridExtra* (Auguie, 2012) y *ggplot2* (Wickham, 2009) del software R (R-Core-Team, 2012) e InfoStat (Di Rienzo et al., 2012).

Resultados

Los valores totales y promedios de UFC filamentosas por gramo de suelo (Figura 4) se estimaron a partir de los recuentos en placa realizados en medio APGRBC. Los valores de UFC de levaduras por gramo de suelo se estimaron en medio AM (Figura 5).

El valor máximo de UFC filamentosas/g para la temporada 2010 ($2,85 \times 10^5$ UFC/g) se registró en el tratamiento que había recibido una dosis de glifosato simple (B). El número máximo de UFC de levaduras registrado durante ese período fue $4,24 \times 10^6$ UFC/g, en el suelo control (A). Durante el ensayo de la temporada 2011, el número máximo de UFC filamentosas fue $1,34 \times 10^6$ UFC/g suelo y se registró en el tratamiento con combinación de glifosato y 2,4-D en dosis simples (D), El número máximo de UFC de levaduras por gramo de suelo recuperadas en la temporada 2011 fue de 1×10^6 UFC/g, y provenía al igual que en la temporada 2010, del suelo control (A). El valor promedio de los recuentos de UFC filamentosas para la temporada 2010 fue $9,2 \times 10^4$ UFC/g y para la temporada 2011 fue $3,74 \times 10^5$ UFC/g.

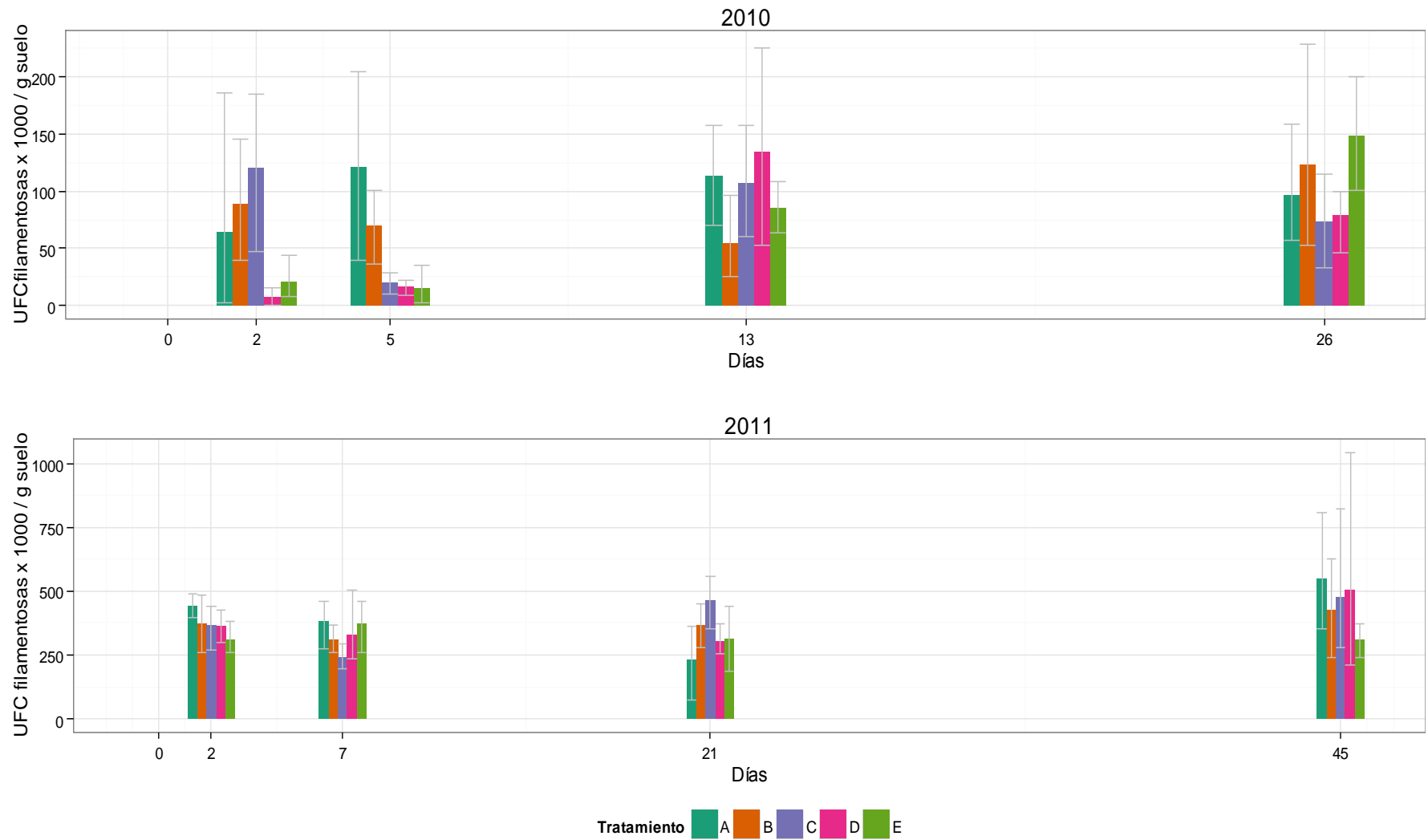


Figura 4: UFC filamentosas / g suelo promedio contadas en medio PGBRC para cada tratamiento. Para cada año el día 0 corresponde a la aplicación de los herbicidas. A: control; B: Glifosato 1x; C: Glifosato 2x; D: Glifosato 1x +2,4-D 1x; E: Glifosato 2x+ 2,4-D 1x. Las barras indican el error estándar.

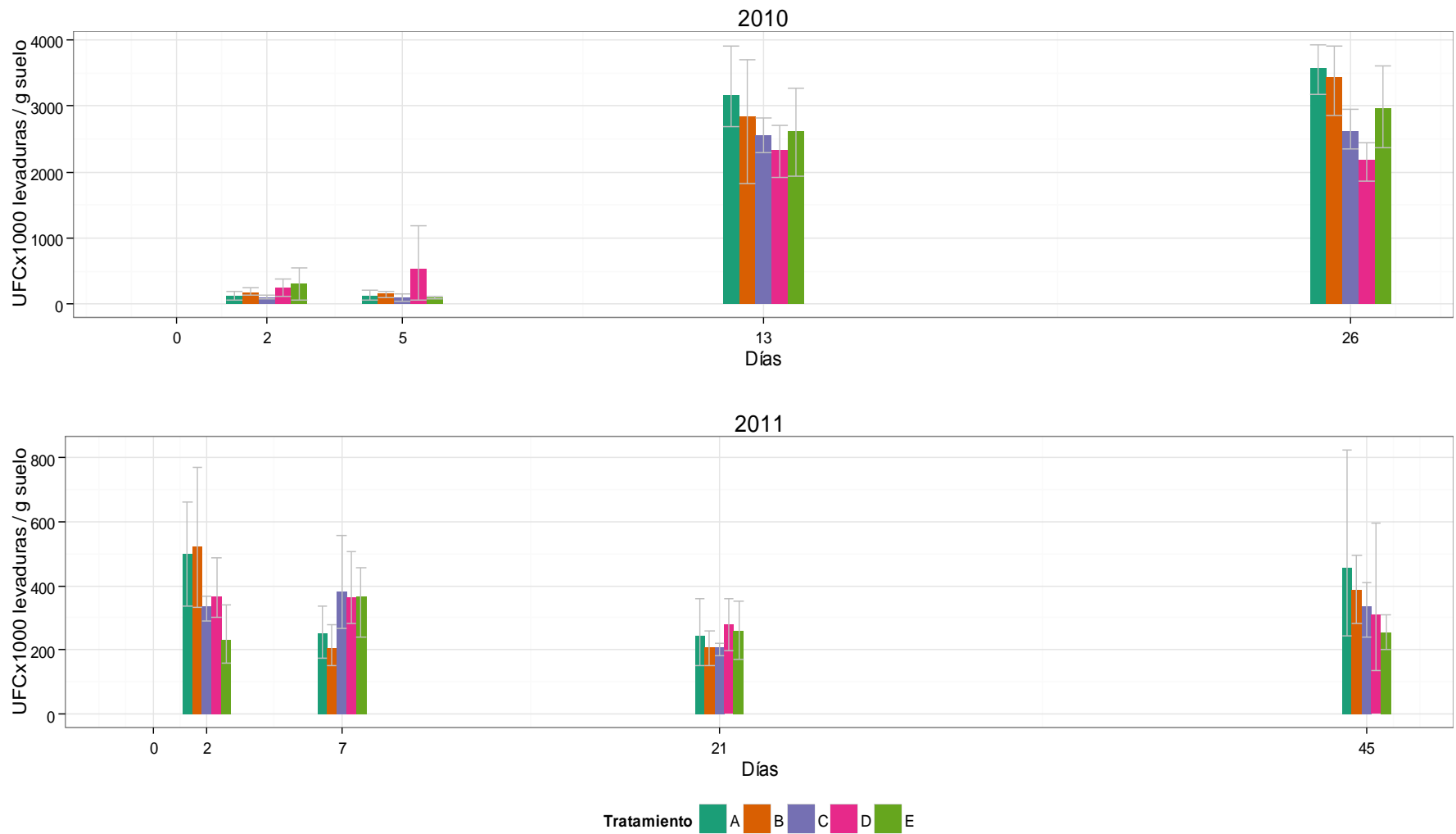


Figura 5: UFC levaduras / g suelo promedio contadas en medio AM. Para cada año el día 0 corresponde a la aplicación de los herbicidas. A: control; B: Glifosato 1x; C: Glifosato 2x; D: Glifosato 1x +2,4-D 1x; E: Glifosato 2x+ 2,4-D 1x. Las barras indican el error estándar.

Para realizar los análisis estadísticos se tuvieron en cuenta los recuentos en medio PGBRC. A partir del ANOVA se observó una variación anual en el número de UFC/g suelo ($F_{(1,147)}=3,905$, $p<0,0001$), siendo mayor el valor registrado en la temporada 2011 respecto a la 2010. El efecto de los diferentes tratamientos con herbicidas no provocó una respuesta diferencial en el número de UFC/g de suelo registradas ($F_{(4,147)}=0,68$, $p=0,6$). A su vez, dentro de la temporada 2010 se observó una respuesta diferencial en el número de UFC/g suelo en función de los días posteriores a la aplicación de los herbicidas siendo los valores estimados para el día 5, en promedio, menores que para el resto de los días ($F_{(1,66)}=8,68$, $p<0,01$). En la temporada 2011 no se observó esta respuesta diferencial del número de UFC/g suelo en función de los días posteriores a la aplicación ($F_{(1,67)}=3,05$, $p=0,08$), y no se detectaron diferencias entre los valores medios de las UFC/g suelo para los distintos tratamientos ($F_{(4,67)}=0,34$, $p>0,8$) (Figura 6).

La biomasa fúngica, estimada a partir de los recuentos de UFC, varió entre 0,235 y 31 g/kg de suelo (Figura 7). Tanto el máximo como el mínimo valor se registraron en muestras provenientes del tratamiento en el cual se aplicó una combinación de glifosato y 2,4-D en dosis simples (D).



Figura 6: UFC filamentosas / g suelo. Para cada año el día 0 corresponde a la aplicación de los herbicidas. A: control; B: glifosato 1x; C: glifosato 2x; D: glifosato 1x+2,4-D 1x; E: glifosato 2x+2,4-D 1x.

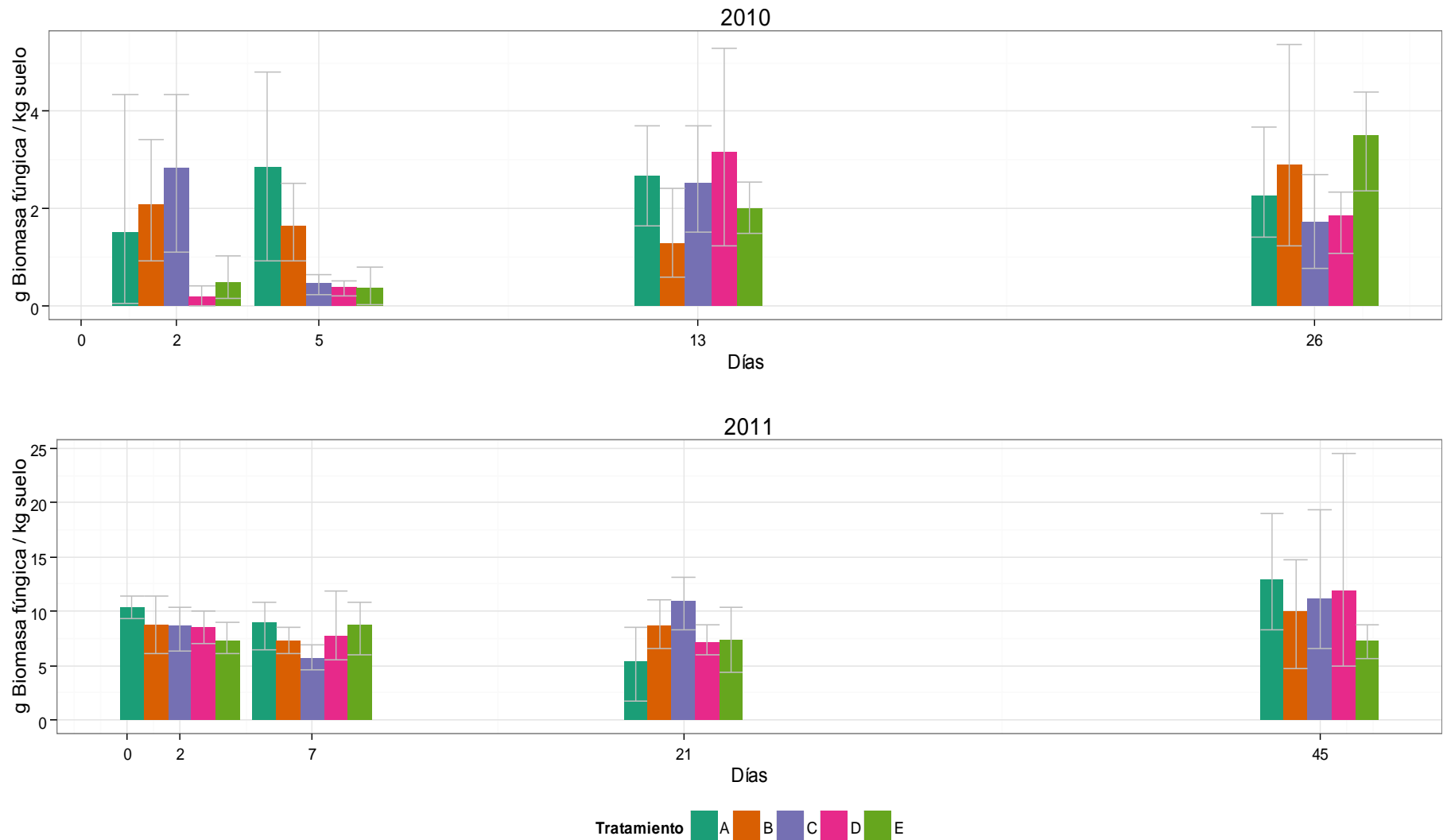


Figura 7: Biomasa fúngica estimada como g biomasa fúngica / kg suelo Para cada año el día 0 corresponde a la aplicación de los herbicidas. A: control; B: glifosato 1x; C: glifosato 2x; D: glifosato 1x+2,4-D 1x; E: glifosato 2x+2,4-D 1x. Las barras indican el error estándar.

En cuanto a las condiciones climáticas registradas durante los dos períodos de muestreo, se puede decir que en la temporada 2010 la temperatura promedio (9,3 °C) y las precipitaciones totales del período (29,4 mm, concentradas en 3 lluvias mayores a los 6 mm) fueron menores que para la temporada 2011, en la cual la temperatura promedio fue de 11,1 °C y las precipitaciones totales fueron de 34,4 mm, y estuvieron concentradas principalmente en una sola lluvia de más de 30 mm a mitad del período de muestreo. En la Figura 8 se muestran los datos climáticos correspondientes a los períodos muestreados. En la Tabla 1 se muestran los valores de temperatura promedio y las precipitaciones acumuladas para la semana anterior a cada fecha de muestreo para las temporadas 2010 y 2011.

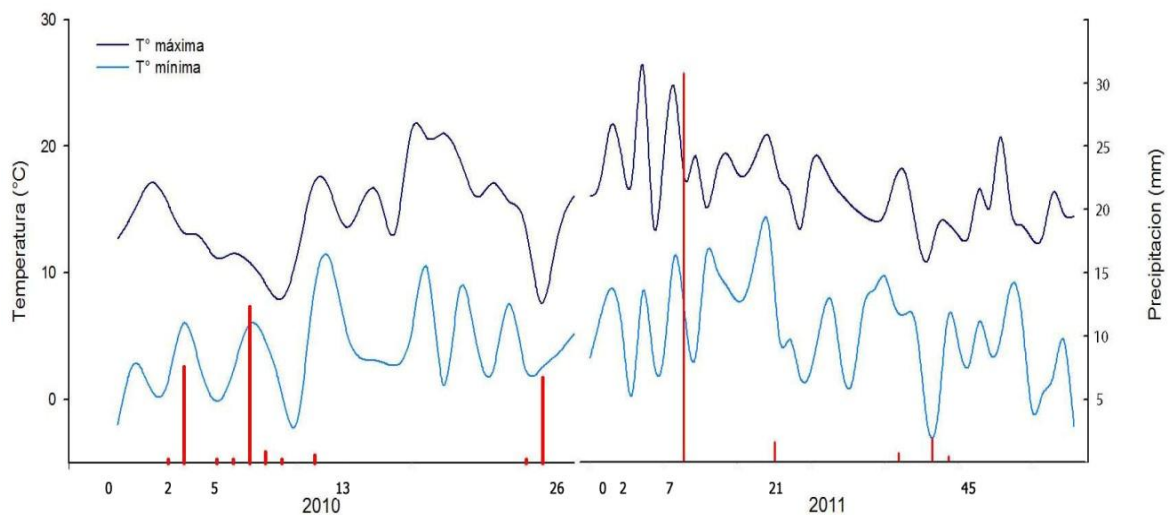


Figura 8: Datos climáticos de los períodos de ensayo 2010 y 2011. Se muestran las precipitaciones (barras rojas) y las temperaturas máximas y mínimas para cada día. El día 0 para cada año, corresponde a la aplicación de herbicidas, se indican a su vez los días de muestreo.

Cuando los datos se analizaron estadísticamente se encontró que los valores de temperatura registrados durante los 7 días previos a cada fecha de muestreo fueron mayores para la temporada 2011 ($F_{(1,6)}= 12,8$, $p<0,05$). Para el caso de las precipitaciones acumuladas durante una semana previa a cada muestreo, no se hallaron diferencias significativas entre años ($F_{(1,6)}=0,02$, $p>0,8$). Sin embargo, se puede observar en la Figura 8 la ocurrencia de un valor de precipitación extremo en la temporada 2011, días antes de la 3^{ra} fecha de muestreo.

Año	Día	Temperatura (°C)	Precipitación acumulada (mm)
2010	2	6,3	0,3
	5	7,9	8,2
	13	8,8	14
	26	9,7	7
2011	2	11,8	0
	7	12,6	0
	21	12,1	31,9
	45	9,8	2

Tabla 1: Datos meteorológicos. Se muestra la temperatura promedio y las precipitaciones acumuladas para los 7 días previos a cada fecha de muestreo.

Con respecto a los aislamientos e identificaciones de los hongos filamentosos recuperados, se pueden observar placas de Petri luego de 14 días de cultivo (Figura 9). Se puede ver que algunos hongos que forman colonias bien definidas son fácilmente distinguibles como una UFC. A su vez, en las fotos de la imagen se puede observar que para aquellos que presentan un crecimiento micelial abundante (como los Mucorales) fue más difícil diferenciar e individualizar las UFC cuando las placas han sido cultivadas 14 días.

Del total de UFC observadas, se recuperaron en cultivo puro 104 aislamientos. Cerca de un 20 % (24 cepas) no produjeron estructuras reproductivas que permitieran su identificación y se nombraron como “micelio estéril” en forma consecutiva. En la Tabla 2 se muestra el listado total de especies aisladas, detallando la cantidad de aislamientos obtenidos a partir de cada tratamiento (A, B, C, D y E).

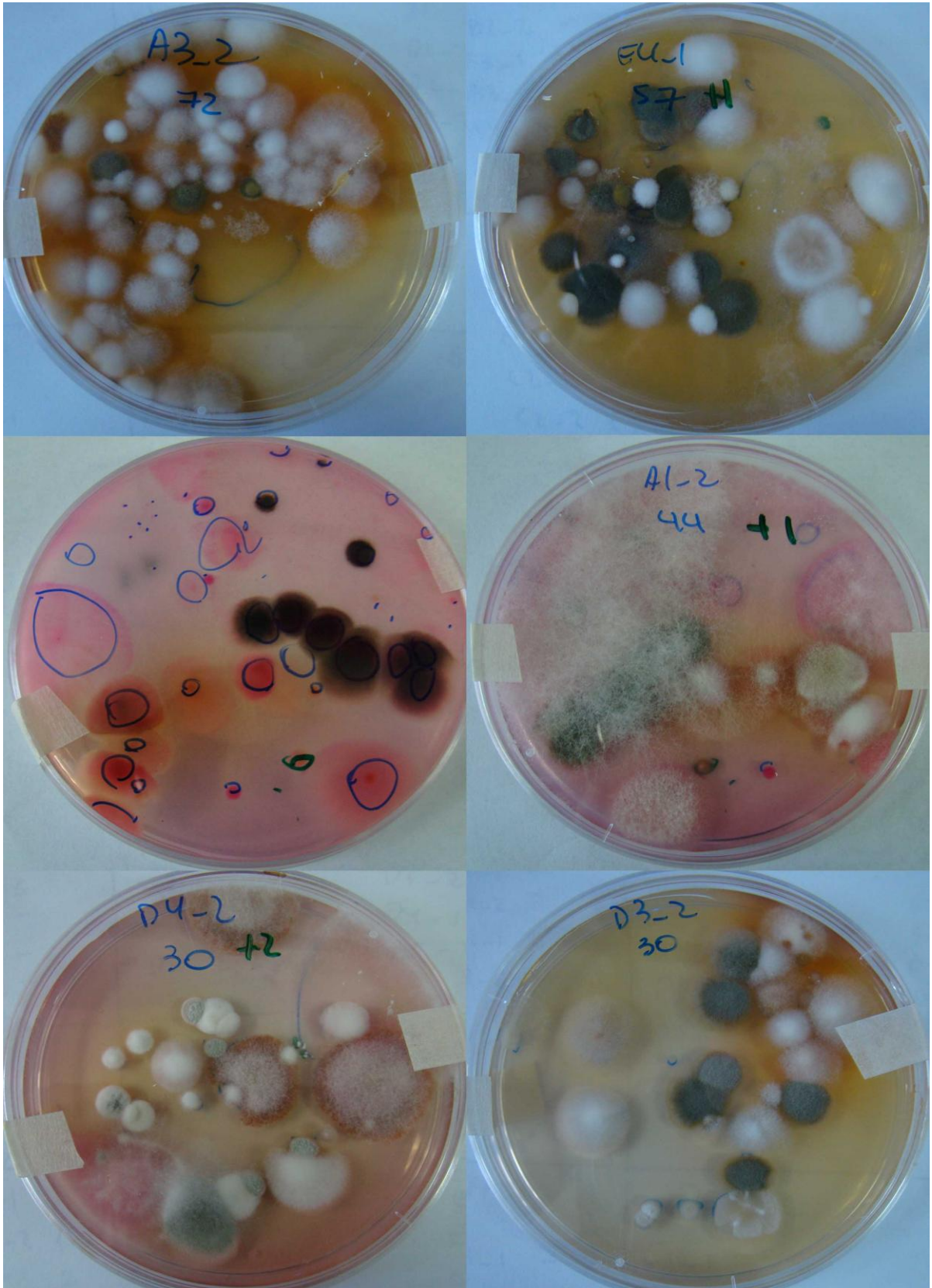


Figura 9: Recuento de UFC en medio PGBRC luego de 14 días de cultivo.

	Género	Especie	Control	Glif 1x	Glif 2x	Glif 1x+2,4D	Glif 2x+2,4D
Mitospóricos	<i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>		2	1		1
	<i>Alternaria</i>	<i>A. augustiovoidea</i>	2	1			1
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>	1	1	1		
	<i>Cladosporium</i>	<i>C. cladosporioides</i>					1
	<i>Cladosporium</i>	<i>C. sphaerospermum</i>	1			1	1
	<i>Curvularia</i>	<i>C. spicifera</i>					1
	<i>Diplodia</i>	<i>D. sp</i>	1				
	<i>Epicoccum</i>	<i>E. purpurascens</i>			1	1	1
	<i>Fusarium</i>	<i>F. sp</i>	1			1	1
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. hamatum</i>	1		1		
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. harzianum</i>	1	1		1	
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. koningii</i>				1	
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. pseudokoningii</i>			1	1	
	<i>Penicillium</i>	<i>P. brevicompactum</i>	1				
	<i>Penicillium</i>	<i>P. citrinum</i>	1	1		1	1
	<i>Penicillium</i>	<i>P. italicum</i>	1				
	<i>Penicillium</i>	<i>P. restrictum</i>				1	
	<i>Penicillium</i>	<i>P.oxalicum</i>	1			1	
	<i>Penicillium</i>	<i>P. sp.</i>		1			
	<i>Scopulariopsis</i>	<i>S. candida</i>	2	1	1		
<i>Scopulariopsis</i>	<i>S. sp.</i>	1	3	1			
Mucorales	<i>Mucor</i>	<i>M. hiemalis</i>		6			
	<i>Mucor</i>	<i>M. racemosus</i>	4				
	<i>Rhizopus</i>	<i>R. stolonifer</i>	3	5	5		3
	<i>Rhizopus</i>	<i>R. oryzae</i>					4
Micelio Estéril	Micelio estéril #1		1				
	Micelio estéril #2			1			
	Micelio estéril #3			1			
	Micelio estéril #4				1		
	Micelio estéril #5		1				
	Micelio estéril #6		1				
	Micelio estéril #7					1	
	Micelio estéril #8			1			
	Micelio estéril #9						1
	Micelio estéril #10				1		
	Micelio estéril #11		1				
	Micelio estéril #12		1				
	Micelio estéril #13				1		
	Micelio estéril #14			1			
	Micelio estéril #15					1	
	Micelio estéril #16		1				
	Micelio estéril #17			1			
	Micelio estéril #18				1		
	Micelio estéril #19		1				
	Micelio estéril #20			1			
	Micelio estéril #21		1				
	Micelio estéril #22		1				
	Micelio estéril #23		1				
	Micelio estéril #24		1				
N° aislamientos		33	28	16	11	16	
N° especies		15	10	8	9	10	

Tabla 2: Listado de especies fúngicas recuperadas. A: control; B: glifosato 1x; C: glifosato 2x; D: glifosato 1x+2,4-D 1x; E: glifosato 2x+2,4-D 1x.

De los aislamientos restantes, se identificaron 25 especies distribuidas en 12 géneros de hongos filamentosos. Los hongos mitospóricos fueron los más abundantes (62,5 %), siendo los géneros más frecuentes *Alternaria*, *Penicillium*, *Scopulariopsis* y *Trichoderma*. Los géneros de Mucorales representaron un 37,5 % del total de aislamientos identificados, siendo *Rhizopus* sp. y *Mucor* spp. las especies aisladas con mayor frecuencia (Figura 10). Del suelo control se recuperó el mayor número de especies (15) y el menor (8) se registró en el suelo con dosis doble de glifosato.

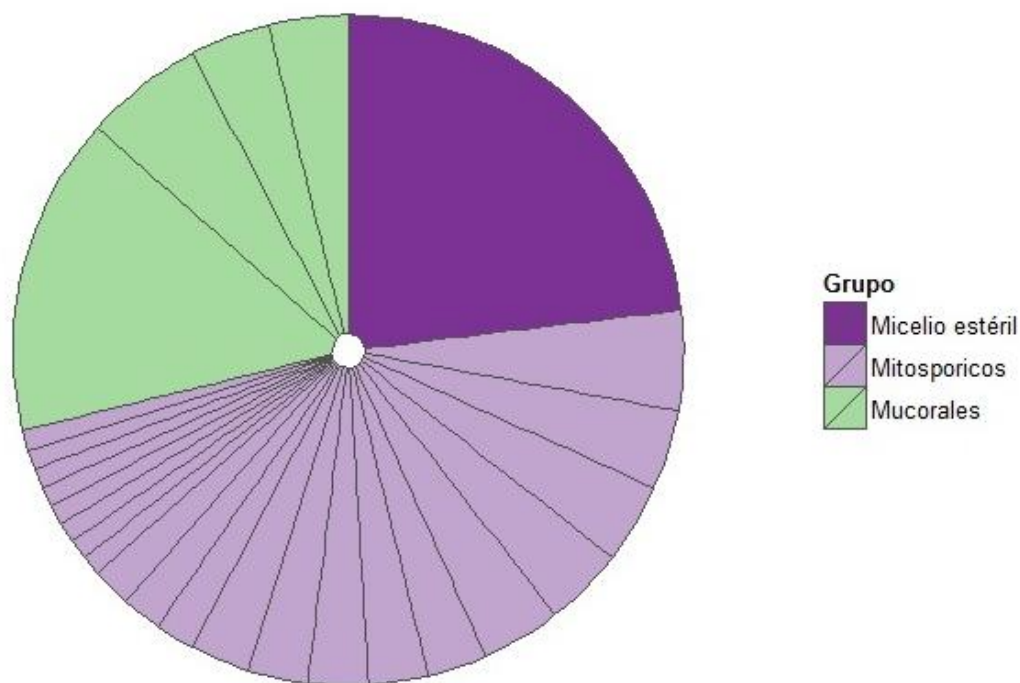


Figura 10: Abundancia de los grupos de hongos aislados en cultivo puro a partir de las muestras de suelo. Micelio estéril 24 cepas, hongos mitospóricos 50 cepas, mucorales 30 cepas.

En los suelos tratados se observó una disminución en el número de especies recuperadas respecto al suelo control, igualmente ninguna de las especies fúngicas fue recuperada a partir de todos los tratamientos (A, B, C, D y E). En la Figura 11 se ilustra el número de aislamientos obtenidos de acuerdo al tratamiento al que fuera sometido el suelo.

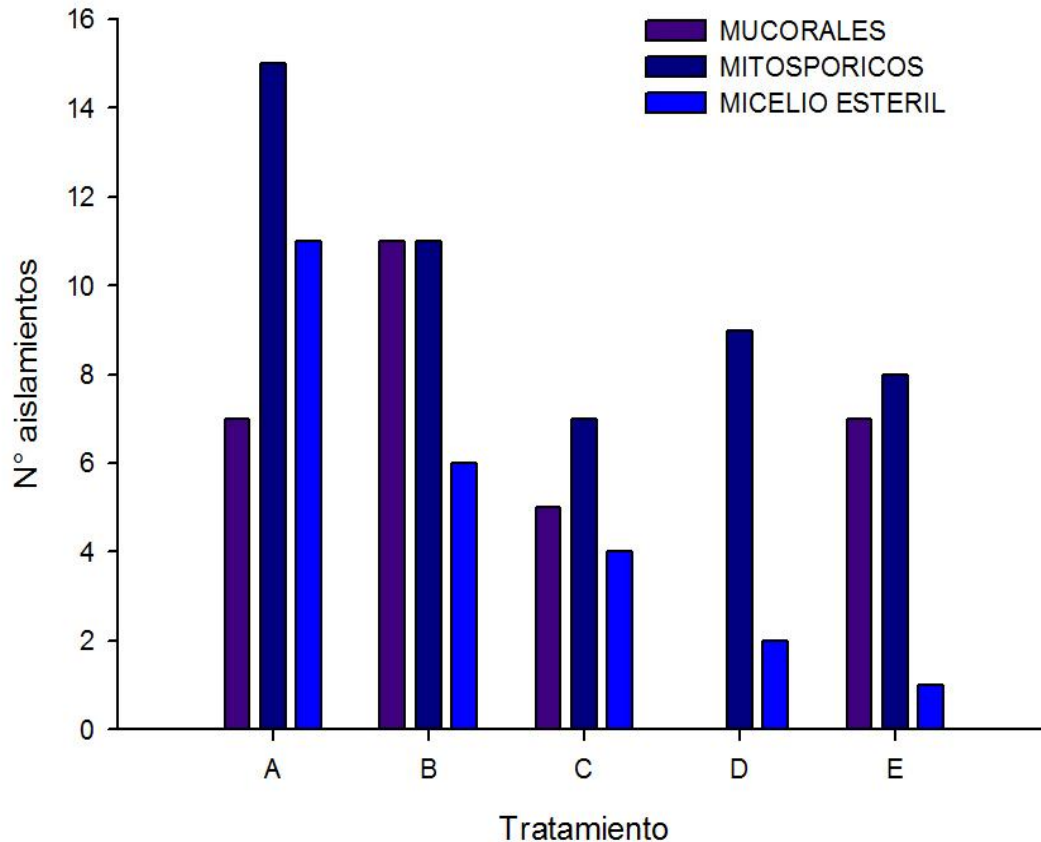


Figura 11: Número de aislamientos obtenidos en cultivo puro a partir de suelos sometidos a los distintos tratamientos de herbicidas diferenciados entre hongos mitospóricos, mucorales y micelio estéril. A: control, B: glifosato 1x, C: glifosato 2x, D: glifosato 1x + 2,4-D 1x, E: glifosato 2x + 2,4-D 1x.

El número de aislamientos obtenidos a partir del suelo tratado con dosis doble de glifosato solo ó en combinación con 2,4-D (tratamientos C, D y E) varió entre 16 y 11, y para el suelo tratado con dosis simple de glifosato (B) y el control (A), se obtuvieron 33 y 28 aislamientos, respectivamente. A partir del suelo que recibió un tratamiento combinado de glifosato 1x + 2,4-D (tratamiento D), solo se recuperaron aislamientos de ascomicetes, en su mayoría representantes de los géneros *Trichoderma* y *Penicillium*, junto con 2 aislamientos de micelio estéril. A partir de los suelos tratados con una combinación de glifosato 2x + 2,4-D (E), los aislamientos obtenidos pertenecieron a los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Fusarium* y *Rhizopus*.

Discusión

Aplicando un método cultivo dependiente, se estudió la composición taxonómica y se estimó la biomasa fúngica en un suelo de una región agrícola del SO bonaerense. Ese suelo, Haplustol típico, con bajo contenido de materia orgánica, no tenía historia de aplicación de herbicidas.

La mayoría de las especies de hongos pueden, potencialmente, cumplir parte de su ciclo de vida en el suelo y por lo tanto ser aisladas del mismo (Gams, 2007). La diversidad fúngica real del suelo es mucho mayor a cualquier valor estimado, debido a que no todos los hongos son cultivables (Hill et al., 2000; Jeewon y Hyde, 2007). Se calcula que solo un 0.1 % de los microorganismos típicamente encontrados en el suelo son aislados usando métodos cultivo dependientes (Hill et al., 2000). Usando la técnica de diluciones de suelo y posterior siembra en placa se obtuvieron 104 aislamientos de hongos filamentosos. Todas las especies fúngicas aisladas son habitantes comunes del suelo (Domsch, 1980; Watanabe, 2002) y habían sido previamente citadas para la provincia de Buenos Aires, en la región interserrana o en suelos agrícolas (Cabello, 1985 y 1986; Aon et al., 2001; Moreno et al., 2013). Las especies con mayor ocurrencia durante los aislamientos fueron *Mucor hiemalis* y *Rhizopus stolonifer*, dos hongos cosmopolitas pertenecientes al grupo de los Mucorales, ya citados para suelos bonaerenses (Cabello, 1985 y 1986; Moreno et al., 2013). Las especies de ascomicetes mitospóricos encontradas representando a géneros tales como *Alternaria*, *Penicillium*, *Scopulariopsis* y *Trichoderma* son habitantes comunes del suelo y también habían sido citadas para la provincia de Buenos

Aires (Cabello, 1985 y 1986; Aon et al., 2001; Gaspar et al., 2001; Moreno et al., 2013).

La cantidad e identidad de especies recuperadas, así como también el número de aislamientos obtenidos en el presente trabajo coincide en gran parte, con los registrados por Aon et al. (2001), Cabello et al. (2003) y por Gaspar et al. (2001). Los valores de biomasa estimados fueron mayores a los mencionados allí. Cabe destacar que si bien los suelos de ambos trabajos recibieron tratamiento con glifosato solo o en combinación con 2,4-D, las características edafológicas de ambos suelos son diferentes, Aon et al. (2001) y Gaspar et al. (2001) estudiaron suelos de tipo Arguidol con un contenido de materia orgánica y humedad distintas a los del suelo estudiado en el presente trabajo.

De acuerdo al ANOVA, la aplicación de los diferentes tratamientos no tuvo un efecto significativo sobre la biomasa fúngica. Sin embargo, tanto el número de especies recuperadas como el de aislamientos fueron mayores a partir del suelo control, dejando entrever que la aplicación de los herbicidas podría tener un efecto, que no pudo ser estadísticamente validado con la metodología aquí aplicada.

Conforme con los resultados expuestos por Bode et al. (1986), los mayores recuentos de UFC de levaduras fueron registrados en suelos sin aplicación de glifosato. Bode et al. (1986) evaluaron los efectos de este herbicida sobre diversas especies de levaduras y encontraron que, independientemente de la vía metabólica inhibida por el herbicida, el glifosato tiene un efecto negativo sobre el

crecimiento de las mismas. Los resultados aquí obtenidos refuerzan la hipótesis del efecto inhibitor del glifosato sobre las levaduras del suelo, también mencionado anteriormente por Carlisle y Trevors (1988).

Las variaciones en las condiciones climáticas afectan en gran medida la actividad microbiana en el suelo. Los microorganismos del suelo responden a cambios en las condiciones climáticas, adecuándose a la nueva situación o a través de sus estructuras de resistencia (Bååth y Söderström, 1982; Talley et al., 2002). La biomasa fúngica presenta una clara relación con los cambios en las condiciones climáticas (Bardgett et al., 1999; Frey et al., 1999; Bateman y Murray, 2001; Talley et al., 2002; Schneider et al., 2010; Barbaruah et al., 2012). El aumento de biomasa promedio estimado para la temporada 2011 podría atribuirse a los cambios registrados en las condiciones climáticas de período. Si bien los valores de las precipitaciones no fueron estadísticamente diferentes para ambas temporadas de trabajo, durante la temporada 2011 se registró un pico en las precipitaciones. Bååth y Söderström (1982) encontraron que los cambios en la biomasa fúngica del suelo están directamente relacionados con la humedad del suelo en los días previos al muestreo. Frey et al. (1999) demostraron la existencia de una relación positiva entre la biomasa fúngica y la humedad del suelo. Las temperaturas promedio registradas durante la semana previa a los muestreos mostraron ser estadísticamente superiores para la temporada 2011. Bardgett et al. (1999) hacen referencia a la estacionalidad de biomasa microbiana en el suelo y mencionan que la misma presenta un máximo en coincidencia con el aumento de temperatura. En este contexto (mayores temperaturas promedio y un pico de

precipitaciones) se explicaría el aumento de biomasa registrado en la temporada 2011.

Algunas propiedades microbiológicas del suelo, como la biomasa microbiana, son utilizadas como indicadores de la calidad y salud del suelo (Schloter et al., 2003). Los microorganismos del suelo son ideales para evaluar los efectos de los agroquímicos ya que ellos se ven afectados directa e indirectamente por los mismos. En el caso del glifosato, los efectos directos son causados por la inhibición de la síntesis de aminoácidos (Franz et al., 1997; Busse et al., 2001). Los efectos indirectos están relacionados con cambios en la estructura de la comunidad microbiana del suelo (Busse et al., 2001). Al hacer una revisión bibliográfica, se encuentran opiniones conflictivas en cuanto al impacto que tiene la aplicación de glifosato sobre los hongos del suelo (Tanney y Hutchison, 2010).

Las especies fúngicas que mostraron algún grado de tolerancia, apareciendo en los suelos tratados con la dosis recomendada de glifosato, no necesariamente tuvieron la misma tolerancia a las dosis dobles del herbicida o a la combinación del mismo con 2,4-D. Del total de especies aquí recuperadas, *Rhizopus oryzae*, *Curvularia spicifera* y *Cladosporium cladosporioides*, fueron recuperadas exclusivamente del suelo que recibió una combinación de dosis doble de glifosato más 2,4-D. Este resultado no implica que las mismas no estaban presentes en los suelos sometidos a los otros tratamientos, pero si podría indicar que las mismas presentan una mayor tolerancia. A partir de los resultados del presente trabajo podemos decir que se recuperaron menos especies en cultivo

puro desde los suelos tratados con dosis crecientes de glifosato o en combinación con 2,4-D.

Gran parte de los estudios realizados hasta la fecha en relación al impacto del herbicida glifosato sobre los microorganismos del suelo se basan en ensayos realizados en laboratorio (Busse et al., 2000; Busse et al., 2001; Gaspar et al., 2001). El comportamiento de las especies fúngicas en cultivo no es el mismo que presentan en su ambiente natural. En cultivo *in vitro* las mayoría de las especies fúngicas no toleraban la concentración de glifosato recomendada para la aplicación a campo (Busse et al., 2000; Tanney y Hutchison, 2010). Los resultados aquí encontrados implican que se debe ser cauto con las inferencias realizadas en relación a la tolerancia de los hongos a los herbicidas basándose solo en ensayos de laboratorio ya que las comunidades fúngicas en el suelo se comportan de manera distinta y están influenciadas por diversos factores al mismo tiempo.

Numerosos trabajos citan la tolerancia y la capacidad degradadora de diversos hongos frente a compuestos químicos y herbicidas (Donnelly et al., 1993; Heinfling et al., 1997; Krzyśko-Łupicka y Orlik, 1997; Boschín et al., 2003; Ghosh y Philip, 2004; Yu et al., 2005; Singh y Walker, 2006; He et al., 2007; Krzyśko-Łupicka y Sudol, 2008; Chen et al., 2009; Pinedo-Rivilla et al., 2009; Lu et al., 2011; Vázquez et al., 2013). *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Trichoderma* son géneros citados como tolerantes y en algunos casos degradadores de herbicidas de uso frecuente como el glifosato y el 2,4-D (Krzyśko-Łupicka y Orlik, 1997; Boschín et al., 2003; Castro Jr. et al., 2007). Algunos especies de estos géneros (i.e. *Alternaria alternata*, *Mucor hiemalis*,

Penicillium restrictum, *Penicillium sp.*, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma koningii* y *T. pseudokoningii*) fueron recuperados exclusivamente de las parcelas tratadas con herbicidas, indicando algún grado de tolerancia de las mismas a los herbicidas aplicados.

Si bien los herbicidas no están diseñados con el propósito de tener ningún efecto sobre los microorganismos, en estudios previos diversos autores han demostrado que el glifosato (Wardle y Parkinson, 1990; Haney et al., 2002; Araújo et al., 2003) y el 2,4-D (Wardle y Parkinson, 1990) ejercen algún tipo de cambio, al menos temporal, en las comunidades microbianas del suelo. Bórtoli et al. (2012) mencionan que la aplicación de glifosato tiene efectos poco consistentes sobre la diversidad fúngica del suelo. A su vez, existen numerosos trabajos que señalan el efecto estimulante inicial, al menos temporal, que el glifosato tiene sobre la actividad microbiana en el suelo (Roslycky, 1982; Grossbard y Atkinson, 1985; Stratton y Stewart, 1992; Busse et al., 2001; Haney et al., 2002; Araújo et al., 2003; Ratcliff et al., 2006; Zabaloy et al., 2008; Bórtoli et al., 2012). Araújo et al. (2003) mencionan que la aplicación de glifosato estimula rápidamente la actividad fúngica, y como resultado se obtienen mayores conteos utilizando la metodología de recuento en placa, debido a que muchos microorganismos son capaces de utilizar al herbicida como fuente carbonada (Wardle y Parkinson, 1990; Busse et al., 2001; Araújo et al., 2003; Ratcliff et al., 2006). Los efectos transitorios y estimulantes en la biomasa microbiana producidos por el glifosato, han sido observados en suelos de distintos sitios (Aon et al., 2001; Araújo et al., 2003; Ratcliff et al., 2006; Zabaloy et al., 2008; Bórtoli et al., 2012). En concordancia con

los autores mencionados, se puede decir que en el suelo agrícola estudiado el efecto del glifosato sobre la biomasa fúngica resultó ser transitorio, mostrando un efecto estimulante inicial, entre el día de exposición y los 20 días subsiguientes (Figura 6), llegando a valores máximos de biomasa fúngica entre los días 13 y 26 posteriores a la aplicación del herbicida, para los tratamientos con dosis simples de glifosato (solo o en combinación, B y D, respectivamente).

CAPITULO 2

Estimación directa de la biomasa fúngica de un suelo utilizando un método cultivo-independiente: Tinción directa con Blanco de Calcoflúor.

Introducción

La aplicación de sustancias químicas puede tener efectos beneficiosos o negativos sobre la biota del suelo. En particular, para algunos agroquímicos se ha señalado un efecto negativo sobre la actividad microbiana (Wardle y Parkinson, 1990; Ismail et al., 1996; Bardgett et al., 1999; Frey et al., 1999; Schloter et al. 2003; García-Orenes et al., 2010; Chen et al., 2013).

Por ello, el estudio de parámetros como la biomasa, diversidad y actividad microbianas es relevante para estimar el impacto de la actividad agrícola y comprender los efectos que la aplicación de distintas sustancias pueden tener sobre la biota (Hill et al., 2000; Arshad y Martin, 2002). Su conocimiento es muy valorado en estudios de impacto y contaminación ambiental (Pankhurst et al., 1997; Nielsen, y Winding, 2002; Markert et al., 2003; Buscot y Varma, 2005; Paul, 2006; Jeewon y Hyde, 2007). Las primeras técnicas desarrolladas para estimarlos fueron las metodologías cultivo dependientes junto con las identificaciones morfológicas (Jeewon y Hyde, 2007). En los últimos años, los métodos cultivo independientes han ganado popularidad. Estos métodos pueden diferenciarse en directos e indirectos (Liu et al., 2006). Entre los primeros, las observaciones utilizando microscopía son especialmente apropiadas pues permiten obtener información rápidamente; se usan frecuentemente en estudios microbiológicos de

suelo (Tsuji, 1995), y también son comunes para estudiar microorganismos en ambientes acuáticos ó en el aire (Kogure et al., 1979; Hýsek et al., 1991; Bloem, 1995; Bloem et al., 2004; Li et al., 2012; Haas et al., 2013). Los métodos indirectos se basan en el estudio de propiedades bioquímicas como la actividad enzimática, los perfiles de ácidos grasos o los patrones de uso de distintas fuentes de carbono (“CLPP”) (Söderberg et al., 2004; Liu et al., 2006; Cycoń et al., 2013).

A partir de 1970 la microscopía de fluorescencia acoplada con tinciones específicas se ha vuelto una de las técnicas más empleadas para las determinaciones directas de microorganismos (Hobbie et al., 1977; Palmgren et al., 1986; Ploem y Tanke, 1987; Taylor y Salmon, 1989; Klein y Paschke, 2000; Wijnand et al. 2001; Hieber y Gessner, 2002; Bloem et al., 2004).

Estas técnicas se han usado con éxito para realizar estimaciones de biomasa fúngica, obteniéndose con ellas mejores resultados que con otras (West, 1988; Stahl et al., 1995; Tsuji et al., 1995; Klein y Pascheke, 2000; Nielsen y Winding 2002; Bloem et al., 2004; Aleixo et al., 2014). La elección del colorante depende del tipo de muestra y el objetivo del estudio (Bloem et al., 2004). Los colorantes fluorescentes pueden ser utilizados solos, o en mezclas. El uso de mezclas permite diferenciar entre células activas e inactivas. Uno de los colorantes más usados para estimar biomasa fúngica en muestras de suelos es el blanco de Calcoflúor. El Calcoflúor (Fluorescent Brighthener, FB) tiñe sólo las paredes celulares, que lucen de color azul brillante al ser observadas con epifluorescencia. Bloem et al. (2004) proponen su uso en combinación con quelato de europio, que tiñe de color rojo ADN y ARN. En las muestras de suelo teñidas con esta

combinación FB + quelato de Europio, se pueden diferenciar las células activas, de las muertas o inactivas (Bloem et al., 2004).

El cálculo de la biomasa fúngica en el suelo es complejo, debido a que allí la red de hifas muestra un patrón de distribución heterogéneo (Klein y Paschke, 2004). El tamaño y la cantidad de las hifas fúngicas presentes en ese ambiente están estrechamente relacionados con las condiciones ambientales, la abundancia de recursos y la presencia de sustancias tóxicas, entre otros factores (Klein y Paschke, 2004). Otra dificultad para la estimación directa es que, junto con las hifas, puede haber tinción inespecífica de partículas como arcillas, arena o pequeños clastos, la cual genera en los preparados un fondo teñido que dificulta las observaciones (Bloem et al., 2004).

En un principio, las suspensiones de suelo teñidas con colorantes fluorescentes se filtraban a través de filtros de membrana, los cuales se montaban para su observación al microscopio (Paul y Johnson, 1977; Sakamoto y Oba, 1994; Scheu y Parkinson, 1994). Esta técnica se emplea actualmente para el estudio de hongos micorrícicos y muestras de agua (Roszak y Colwell, 1987; MacIsaac y Stockner, 1993; Weinbauer et al., 1998; Boulos et al., 1999; Baláz y Vosátka, 2001; Liu, 2008), pero para estudiar hongos en sedimentos se desarrollaron técnicas superadoras, como la de “frotis de suelo” propuesta por Paul et al. (1999). Esta metodología fue adoptada en numerosos laboratorios para la observación y conteo de hifas fúngicas a partir de muestras de suelo (Bölter et al., 2002, Li et al., 2004) por ser fácilmente aplicable y de bajo costo en comparación con las que emplean filtros de membrana. Los resultados obtenidos

por Bloem et al. (2004) al comparar ambas técnicas sugieren que la longitud de hifas medida utilizando frotis de suelo puede ser hasta 2 veces mayor que la estimada con filtros de membrana. A su vez, a partir de la longitud de hifas es posible calcular el contenido de carbono fúngico del suelo (Bloem et al., 2004).

En el presente capítulo se utilizará microscopía de epifluorescencia acoplada a tinción específica con FB para estimar la biomasa fúngica en muestras de un suelo tratado con distintas dosis y combinaciones de glifosato y 2,4-D. La metodología propuesta es una medida confiable, estandarizada y comparable para la estimación de la biomasa fúngica total del suelo y proporciona estimaciones comparables a las realizadas utilizando técnicas indirectas (Aleixo et al., 2014).

Dado que no hay registros de la estimación de la biomasa fúngica en suelos agrícolas del SO de la provincia de Buenos Aires, se espera que los resultados obtenidos puedan ayudar a comprender el funcionamiento de las comunidades fúngicas de suelos agrícolas tratados con glifosato y 2,4-D.

Materiales y Métodos

Las estimaciones se realizaron sobre las suspensiones de suelo fijadas con formol 40 %. La concentración de suelo en las soluciones fue 50 mg/ml (ver Capítulo 1).

Preparación de los frotis de suelo

Los frotis de suelo se prepararon sobre portaobjetos de inmunofluorescencia con un diámetro de campo de 11 mm (Lab Sud®). Los portaobjetos se limpiaron con etanol 96 % para remover cualquier material hidrofóbico que pudiera existir en la superficie del vidrio. Las suspensiones de suelo se re-suspendieron por agitación manual durante 30 segundos, para homogeneizar la distribución de las partículas en la suspensión. Luego, de un reposo de 2 minutos, se tomaron 20 µl de la suspensión (~1 g de suelo) y se colocaron en el centro del campo.

Luego de sembrados, los portaobjetos se colocaron en una bandeja plástica sobre papel absorbente y se dejaron secar completamente al aire para fijar la muestra al portaobjetos antes de la tinción. Las muestras se sembraron por cuadruplicado.

Soluciones fluorescentes

Las soluciones de blanco de Calcoflúor (FB) se prepararon disolviendo el FB en NaOH. Una vez que los cristales del FB se disolvieron completamente en

NaOH, las soluciones se llevaron a un volumen final de 100 ml con etanol al 50 %. Luego se filtraron a través de un filtro de membrana de 0,2 μm diámetro de poro Whatman®. Una vez filtradas se conservaron a 2 °C en oscuridad, para evitar el revelado del colorante. Se emplearon 2 concentraciones de FB: 2,5 % y 5 % FB.

Solución Calcoflúor (FB), conservar a 2 °C en oscuridad.

Fluorescent Brighthener 28 FREE ACID Sigma-Aldrich Argentina® (FB)	2,5 ó 5 mg
NaOH solución	~100 gotas
Etanol 96 %	50 ml
H ₂ O _{dest}	46 ml

Tinción de los frotis de suelo

Una vez que los frotis se secaron completamente, se tiñeron con las soluciones de FB preparadas anteriormente. Antes de colocar el colorante, se humedeció con agua el papel absorbente sobre el cual se apoyaban los frotis. A partir de este momento los frotis de suelo se mantuvieron en oscuridad para evitar la exposición de la solución de FB a la luz. Se colocaron 50 μl de solución FB sobre cada frotis durante 60 minutos. Para eliminar el exceso de colorante los frotis se lavaron 3 veces en etanol 50 % durante 5 minutos y por último con agua destilada durante 60 segundos.

Inmediatamente después de teñidos, los frotis se almacenaron a 4 °C en oscuridad hasta su observación. En ningún caso el almacenamiento fue mayor a 60 días.

Observación de los frotis y recuento

Previo a la observación se colocó una gota de aceite de inmersión de baja fluorescencia (Cicarelli[®]) sobre el campo y sobre éste se colocó un cubre-objetos. Las observaciones se realizaron con un microscopio Nikon Eclipse 80i, con accesorio de epifluorescencia, cámara fotográfica incorporada y retículo graduado para el ocular (10x). Se utilizó un filtro de excitación BP 340-380 nm; un divisor de Haz 400 nm y un filtro barrera LP 430 nm, de acuerdo a lo recomendado por Bloem et al. (2004). En cada frotis se ubicaron 5 campos al azar y se contó el número de intersecciones entre las hifas y las líneas de la grilla del retículo observables con el objetivo 20x. En la Figura 12 se muestra un esquema del proceso de conteo.

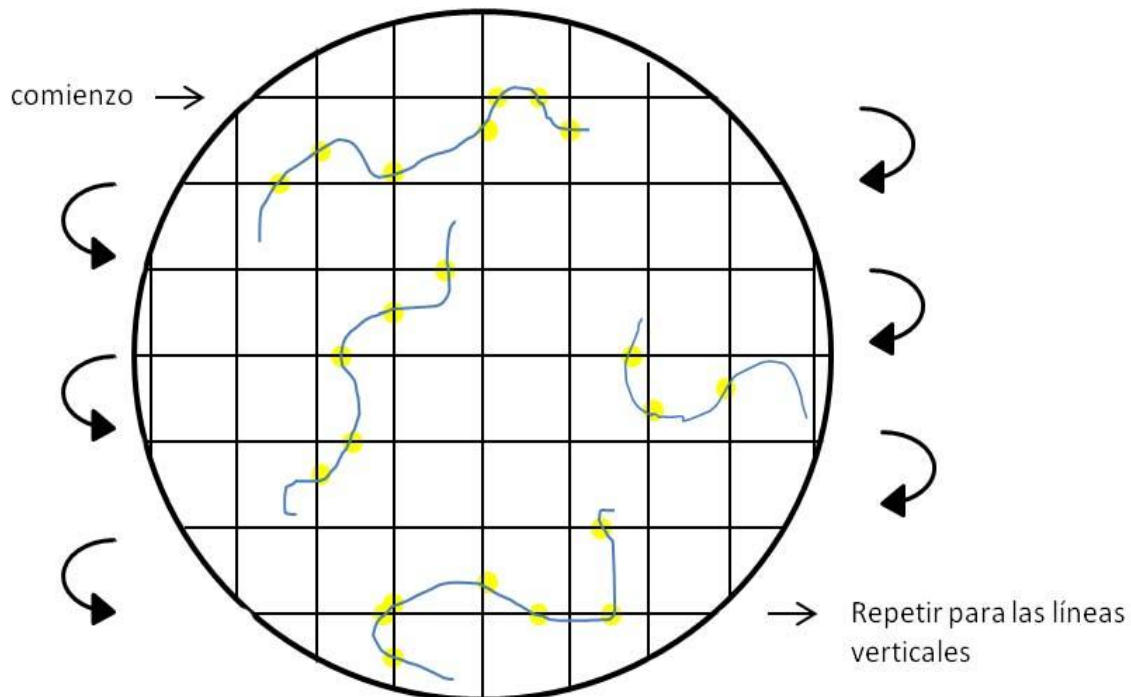


Figura 12: Método de intersección para el conteo de las hifas. (●) Indican las intersecciones con la grilla.

A partir del número de intersecciones, se realizaron los cálculos para estimar la biomasa fúngica por gramo de suelo siguiendo el protocolo propuesto por Bloem et al. (2004).

Cálculos y estimaciones

- Cálculo de la longitud de hifas en la grilla: H , [μm / grilla]

$$H = I \times \pi \times \frac{A}{2L}$$

I = Número de intersecciones por grilla

A = Área de la grilla

L = Longitud total de las líneas de la grilla

- Cálculo de la longitud de las hifas por gramo de suelo: F, [m / g suelo]

$$F = H \times 10^{-6} \times \left(\frac{A}{B}\right) \times \left(\frac{1}{S}\right)$$

H = Longitud total hifas en la grilla (µm / grilla)

10⁻⁶ = Factor conversión µm a m

A = Área del frotis

B = Área de la grilla

S = Cantidad de suelo en el frotis

- Cálculo del bio-volumen de hifas por gramo de suelo: V [µm³ / g suelo].

$$V = \frac{\pi}{4} W^2 \left(F - \frac{W}{3}\right)$$

F = Longitud de hifas por gramo de suelo

W = 2,5 µm Ancho promedio de hifas fúngicas (Bloem et al., 2004)

- Estimación del contenido de carbono fúngico por gramo de suelo.

Se estimó usando un contenido específico de carbono de $1.3 \times 10^{-13} C_{fúngico} \mu\text{m}^{-3}$ (van Veen y Paul, 1979; Bakken y Olsen, 1983) multiplicado por el bio-volumen de hifas (V). Las unidades del contenido de carbono estimado son [µg C fúngico / g suelo].

$$C_{fúngico} g^{-1} suelo = V \times \left(1,3 \times 10^{-13} g C_{fúngico} \mu\text{m}^{-3}\right)$$

$V =$ Bio-volumen
 $1.3 \cdot 10^{-13} \text{ g } C_{\text{fúngico}} \mu\text{m}^{-3} =$ Contenido de carbono específico

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un análisis de la varianza en bloques al azar. Se incorporaron al análisis las variables ambientales registradas. Se calcularon las precipitaciones acumuladas durante los 7 días previos a cada muestreo para incorporar esta variable al análisis. También se calculó el promedio de las temperaturas de los 7 días previos al los muestreos. Se realizó el test de correlación de Pearson entre las estimaciones de biomasa cultivo dependientes (Capítulo 1) y las cultivo independientes estimadas en el presente capítulo.

Para los cálculos y gráficos se utilizaron los paquetes *stats* (R-Core-Team, 2012), *gridExtra* (Auguie, 2012), *ggplot2* (Wickham, 2009) del software R (R-Core-Team, 2012) e InfoStat (Di Rienzo et al., 2012).

Resultados

Se observaron 320 frotis de suelo. La intensidad de la fluorescencia se mantuvo hasta 60 días luego de la tinción. Con la solución 5 % FB se obtuvieron preparados con elevada tinción de fondo y grandes cristales de colorante aún sin disolver, que dificultaron la identificación de las hifas fúngicas (Figura 13 y Figura 14). Con la solución al 2,5 % FB la tinción de fondo fue baja y se observaron pocos cristales, pequeños, que en ningún caso interfirieron con la observación de las hifas fúngicas. Las hifas presentaban un color azul brillante y, si bien diversas partículas de suelo se tiñeron junto con las hifas, al haber menor tinción de fondo las estructuras fúngicas eran fácilmente distinguibles (Figura 15).

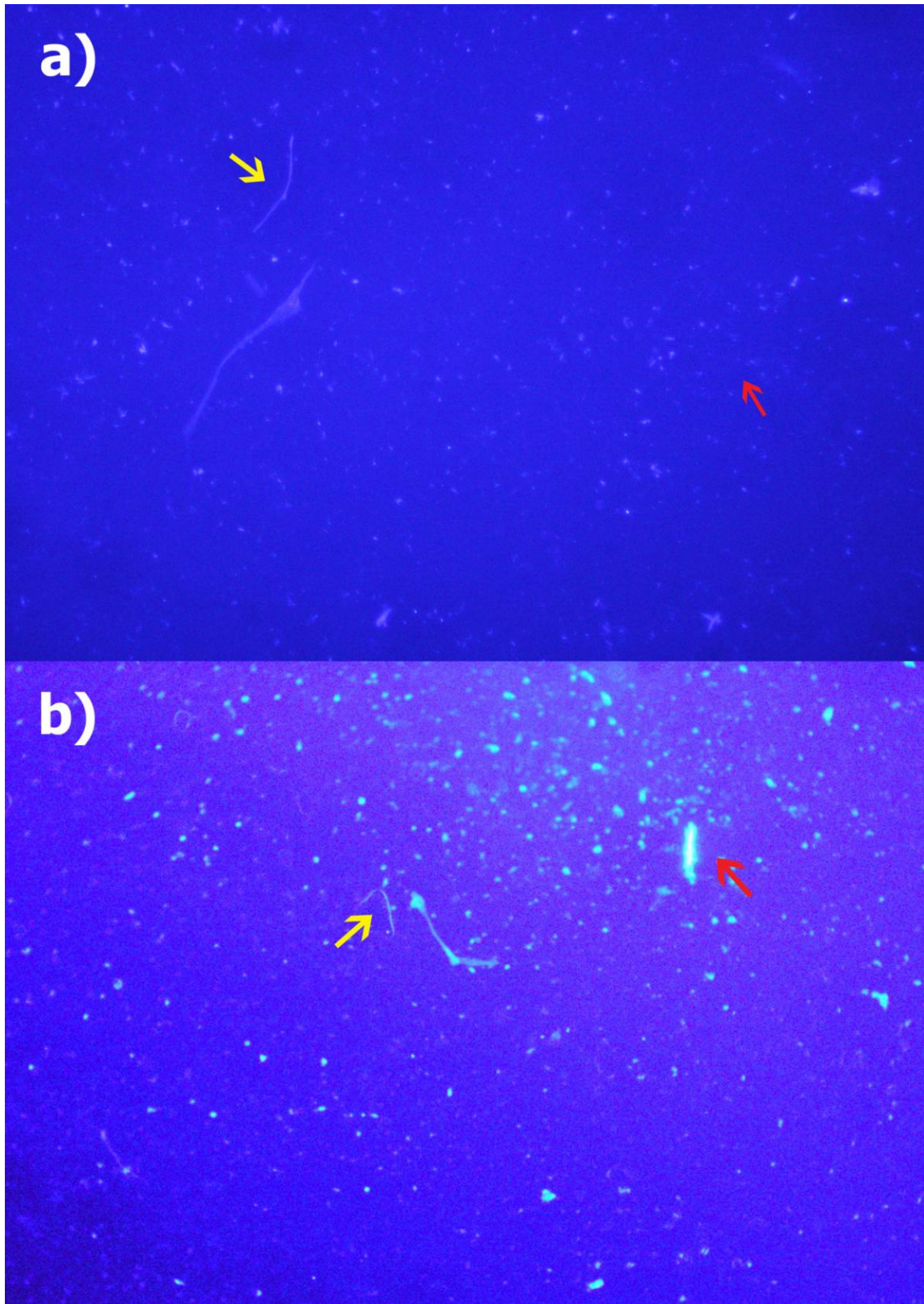


Figura 13: Frotis de suelo teñidos con solución FB 5 %. a) hifa fúngica teñida con FB con poco contraste con el fondo del frotis; b) cristales de FB junto a una hifa. Las flechas rojas marcan los cristales de FB y las flechas amarillas las hifas fúngicas.

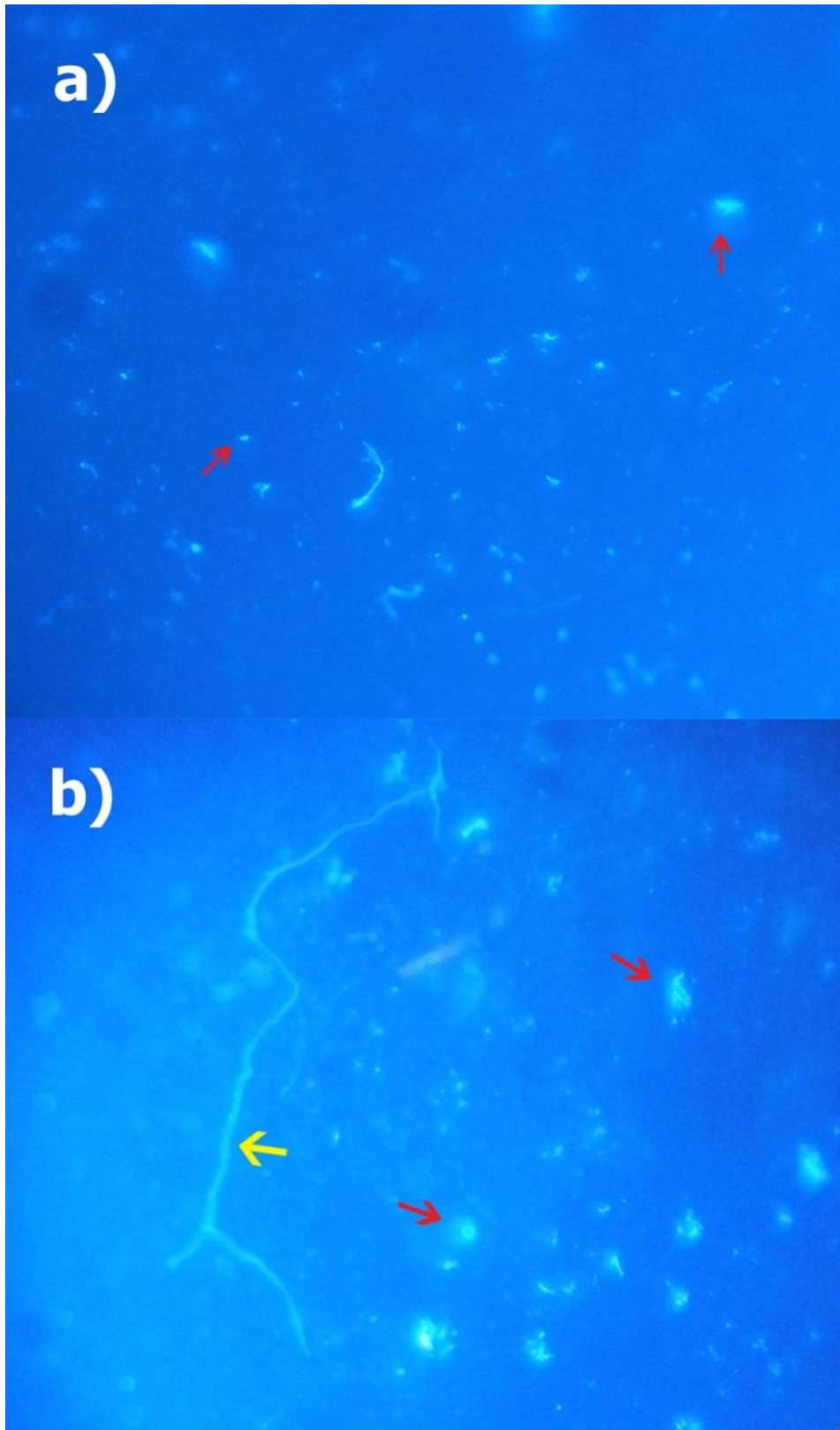


Figura 14: Frotis de suelo teñidos con solución FB 5 %: Tinción de fondo y cristales de FB. a) Fragmentos de hifas y cristales; b) Hifa y cristales de FB. Las flechas rojas señalan los cristales de FB y las flechas amarillas las hifas fúngicas.

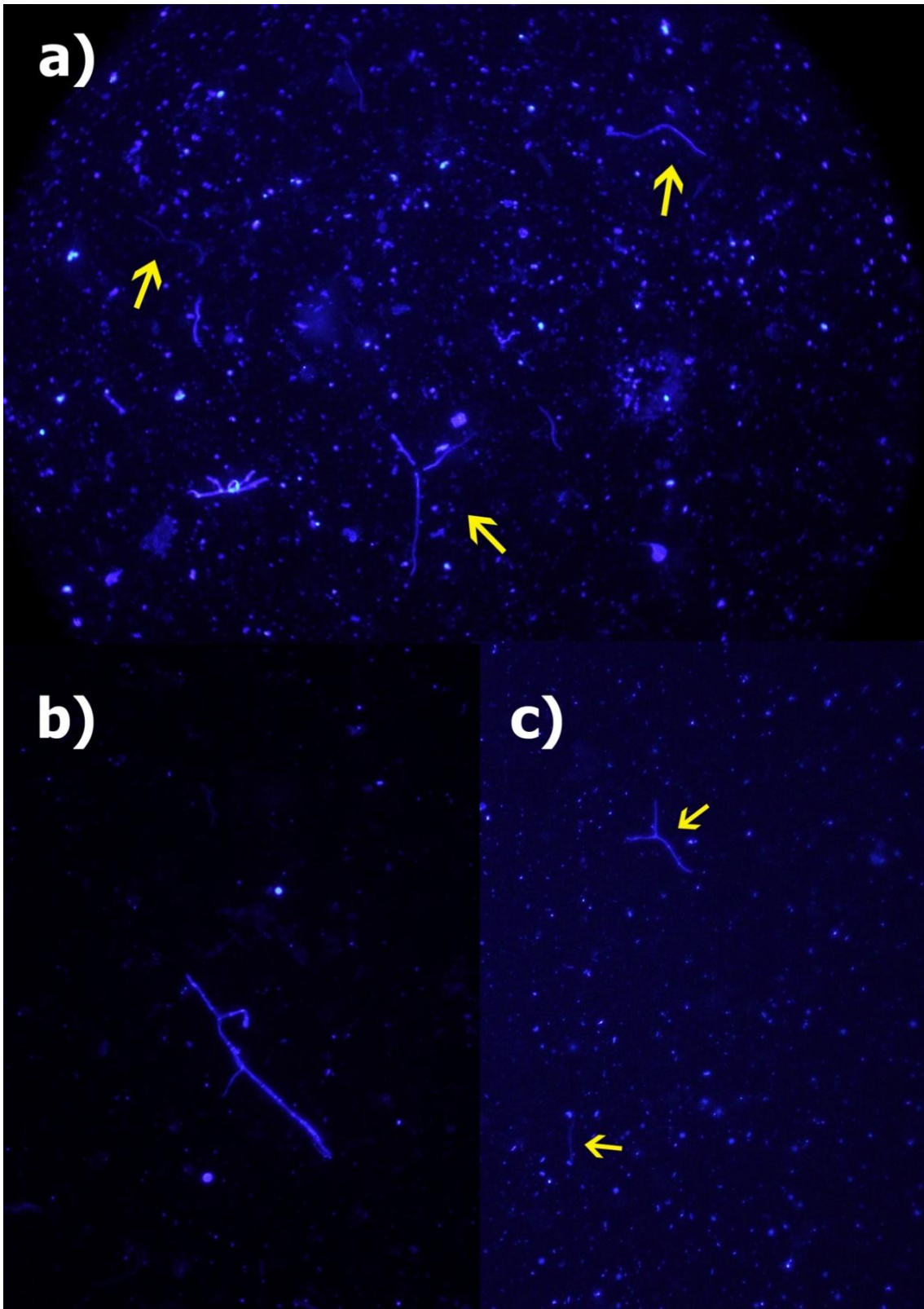


Figura 15: Frotis de suelo teñidos con solución FB 2,5 %. a) Partículas de suelos; b) Hifa fúngica teñida correctamente con FB; c) Pequeños fragmentos de hifas. Las flechas amarillas señalan las hifas fúngicas.

Los valores de biomasa fúngica estimados variaron entre 0,19 y 26,89 $\mu\text{g C}_{\text{fúngico}} / \text{g suelo}$ (Tabla 3). En el tratamiento control la biomasa estimada varió entre 2,24 y 26,89 $\mu\text{g C}_{\text{fúngico}} / \text{g suelo}$. Para la temporada 2010 el valor máximo de biomasa estimada fue 13,8 $\mu\text{g C}_{\text{fúngico}} / \text{g suelo}$ y se registró el quinto día luego de la aplicación de los herbicidas, en el suelo que recibió dosis de glifosato simple (tratamiento B). El valor mínimo de biomasa estimado para la temporada 2010 fue 0,19 $\mu\text{g C}_{\text{fúngico}} / \text{g suelo}$, estimado en el suelo que recibió una combinación de glifosato 1x + 2,4-D 1x (tratamiento D). Para las muestras tomadas durante la temporada 2011, el valor de biomasa máximo fue 26,89 $\mu\text{g C}_{\text{fúngico}} / \text{g suelo}$ estimado en el suelo control (A) y el mínimo (0,75 $\mu\text{g C}_{\text{fúngico}} / \text{g suelo}$) se estimó en la muestra del tratamiento glifosato 1x + 2,4-D 1x (tratamiento D) (Figura 16).

Según los resultados del ANOVA, considerando el efecto de los bloques, tratamientos y temporada de muestreo, los valores de biomasa fúngica, mostraron diferencias significativas entre ambas temporadas ($F_{(1,146)}=16,2$, $p<0,0001$), siendo los valores estimados para la temporada 2010 menores que los registrados en la temporada 2011. Asimismo, el ANOVA detectó diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados al suelo para ambas temporadas ($F_{(4,146)}=4,97$), $p<0,001$).

Año	Día	TRAT	Promedio	Mínimo	Máximo
2010	2	A	5.55	2.8	8.39
	2	B	5.04	2.24	7.83
	2	C	5.83	3.92	8.02
	2	D	4.8	3.36	6.15
	2	E	3.03	2.42	3.54
	5	A	4.35	2.24	7.09
	5	B	8.53	5.78	13.8
	5	C	6.43	5.04	7.83
	5	D	7.27	5.78	9.14
	5	E	4.62	2.24	6.71
	13	A	7.93	7.09	9.14
	13	B	6.2	4.1	8.77
	13	C	6.39	4.66	7.65
	13	D	6.15	4.1	7.46
	13	E	3.31	2.98	3.54
	26	A	7.93	5.6	9.33
	26	B	6.9	4.29	12.68
	26	C	6.71	2.98	12.12
	26	D	2.05	0.19	3.73
	26	E	2.75	1.68	4.29
2011	2	A	10.12	5.22	13.43
	2	B	9	3.73	16.23
	2	C	10.3	7.65	12.68
	2	D	6.71	4.48	10.07
	2	E	7.46	4.85	10.44
	7	A	4.76	2.42	8.77
	7	B	5.73	2.61	10.07
	7	C	6.99	4.29	9.88
	7	D	7.13	3.73	9.51
	7	E	9.23	6.53	15.48
	21	A	20.8	15.67	26.89
	21	B	10.66	7.09	13.24
	21	C	8.35	6.71	10.82
	21	D	7.51	4.1	10.82
	21	E	9.09	7.83	12.12
	45	A	7.04	6.34	8.58
	45	B	5.64	4.66	6.34
	45	C	5.27	4.1	7.27
	45	D	2.66	0.75	5.04
	45	E	2.75	1.12	3.73

Tabla 3: Biomasa fúngica ($\mu\text{g C}_{\text{fúngico}} / \text{g suelo}$). Se muestran los valores promedio, máximos y mínimos estimados para cada tratamiento en todas las fechas de muestreo. A: control; B: Glifosato 1x; C: Glifosato 2x; D: Glifosato 1x + 2,4-D 1x; E: Glifosato 2x + 2,4-D 1x.

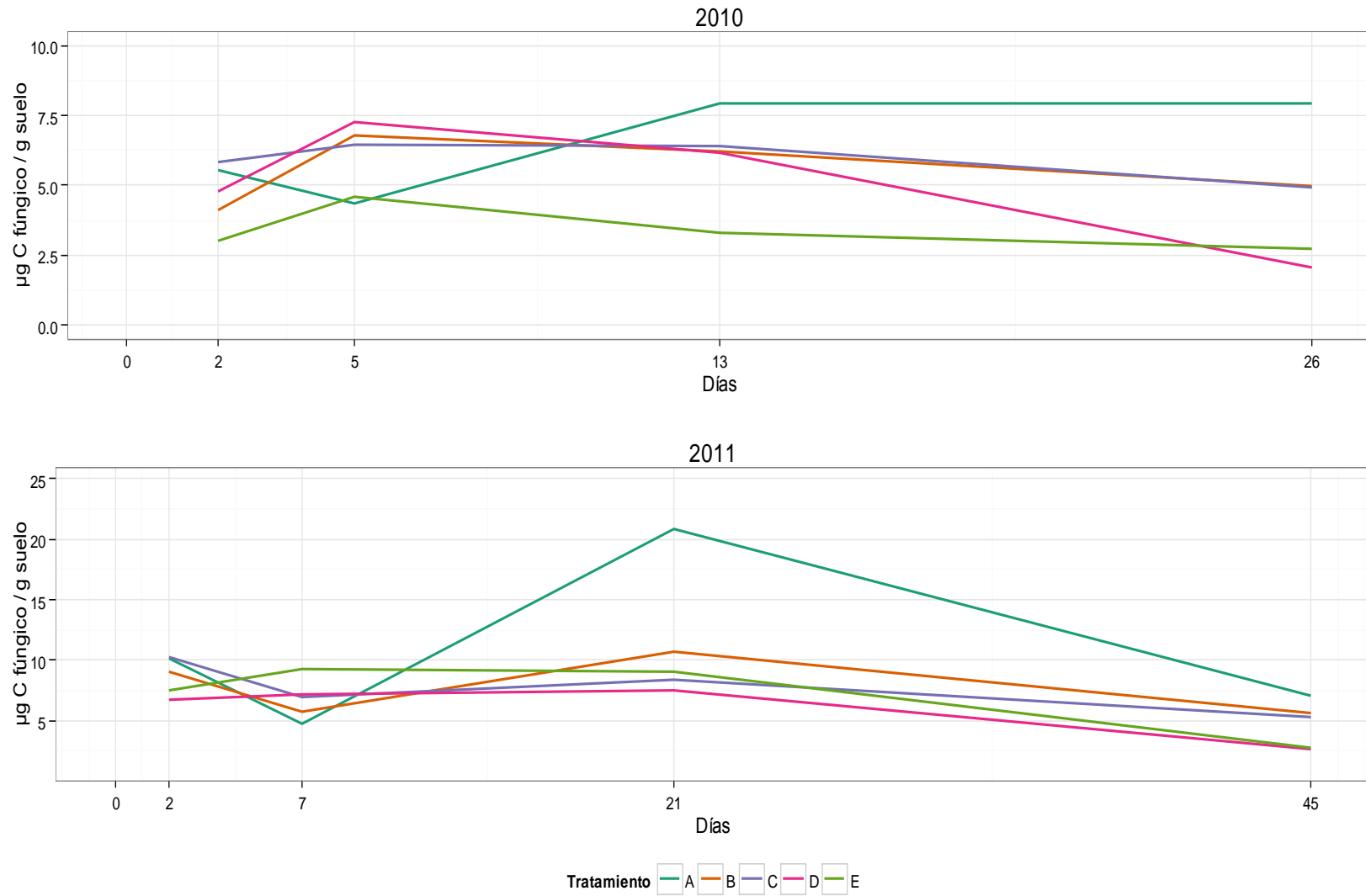


Figura 16: Biomasa fúngica estimada como $\mu\text{g C}_{\text{fúngico}} / \text{g suelo}$. Para cada año el día 0 corresponde a la aplicación de los herbicidas. A: control; B: glifosato 1x; C: glifosato 2x; D: glifosato 1x+2,4-D 1x; E: glifosato 2x+2,4-D 1x.

Para las muestras de la temporada 2010, se halló una interacción significativa entre el tratamiento y la variable días de muestreo, indicando que la biomasa fúngica cambió con respecto al tratamiento aplicado y que esta relación varió en función del tiempo transcurrido luego de la aplicación de los herbicidas ($F_{(4,65)}=2,93$, $p<0,05$). Esta interacción no se halló para las muestras de la temporada 2011 ($F_{(4,67)}=0,63$, $p=0,65$), pero sí se detectaron efectos significativos para los tratamientos ($F_{(4,67)}=2,6$, $p<0,05$) y para la variable días por separado ($F_{(1,67)}=5,96$, $p<0,05$). Por lo tanto, se realizaron comparaciones múltiples entre tratamientos dentro de cada fecha de muestreo aplicando el Test de Tukey al 5%. En la Figura 17 se muestran los valores promedios de biomasa graficados con sus errores estándar y los resultados de las comparaciones múltiples.

La biomasa promedio estimada para el tratamiento control (A) mostró una tendencia a ser mayor a la observada en los suelos tratados con herbicidas (tratamientos B, C, D y E), a excepción de los días 5 y 331. Tanto el día 5 como el 331, se corresponden con el segundo muestreo de las temporadas 2010 y 2011, respectivamente.

La longitud de hifas en el suelo varió entre 0,29 y 42,17 m/g de suelo, esos valores fueron medidos en los tratamientos donde se aplicó una combinación de glifosato y 2,4-D en dosis simples (D) y en el control (A), respectivamente (Figura 18).

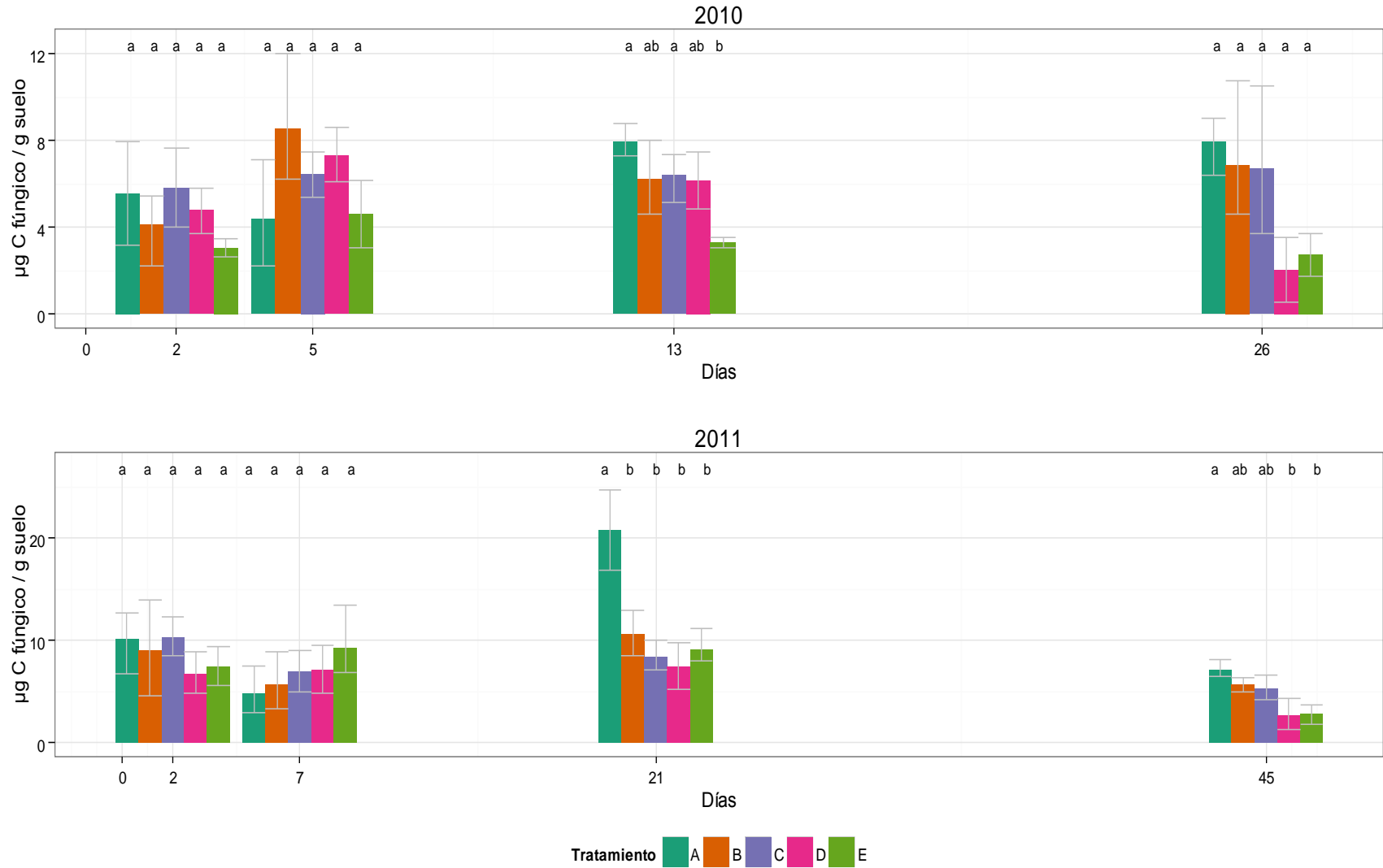


Figura 17: Biomasa fúngica estimada como $\mu\text{g C}_{\text{fúngico}} / \text{g suelo}$. Para cada año el día 0 corresponde a la aplicación de los herbicidas. A: control; B: glifosato 1x; C: glifosato 2x; D: glifosato 1x+2,4-D 1x; E: glifosato 2x+2,4-D 1x. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas para los valores medios del tratamiento (Tukey 5 %). Las barras indican el error estándar.

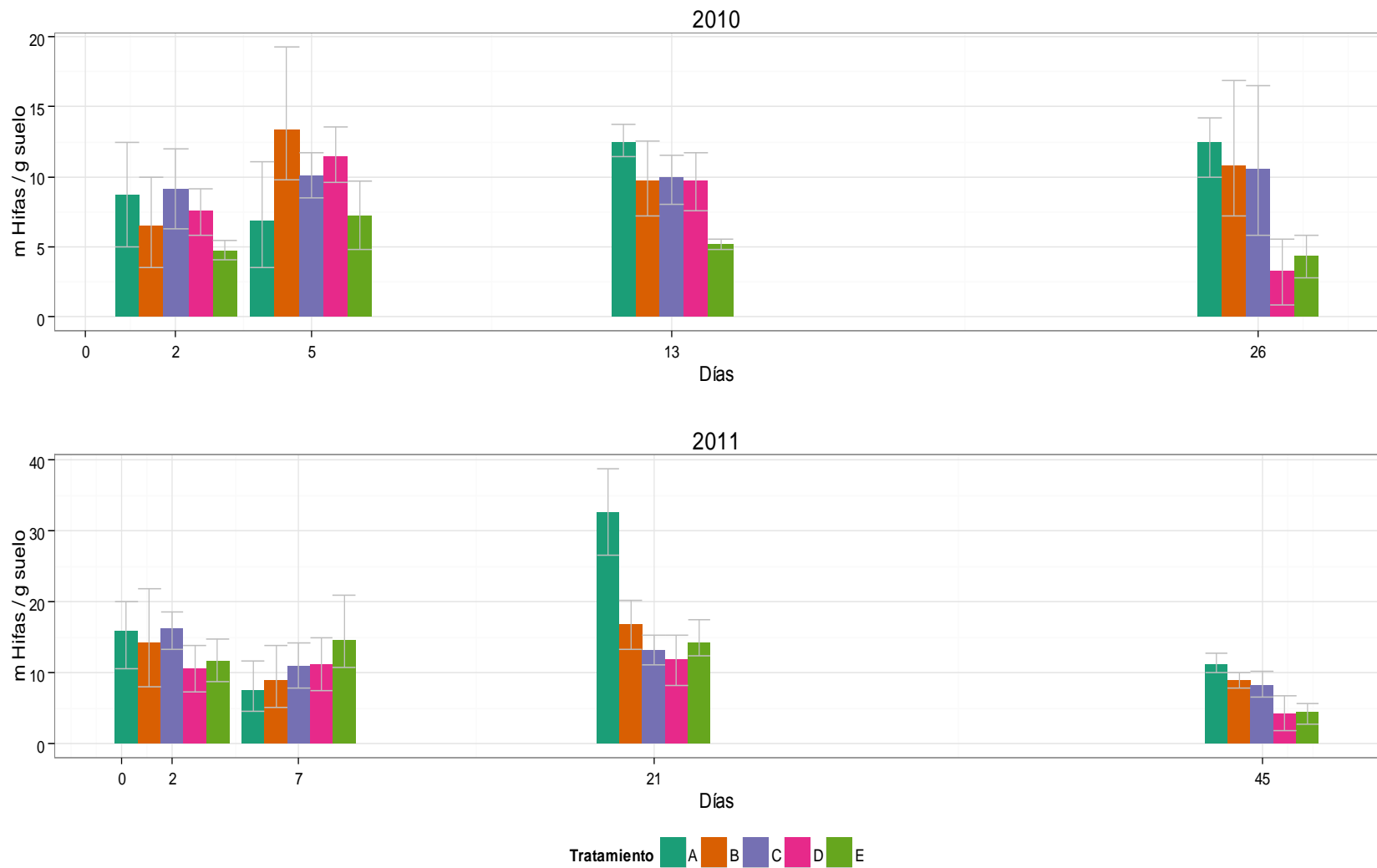


Figura 18: Biomasa fúngica estimada como m hifas / g suelo. Para cada año el día 0 corresponde a la aplicación de los herbicidas. A: control; B: glifosato 1x; C: glifosato 2x; D: glifosato 1x+2,4-D 1x; E: glifosato 2x+2,4-D 1x. Las barras indican el error estándar.

Los coeficientes de correlación de Pearson entre los valores de biomasa estimados como UFC/g suelo y $\mu\text{g } C_{\text{fúngico}}/\text{g } \text{suelo}$, en los diferentes tratamientos (A, B, C, D, y E) para ambas temporadas resultaron en todos los casos ser no significativos ($p > 0,05$), en la Tabla 4 se muestran los valores.

Año	TRAT	Coef. Pearson	p
2010	A	0.081	0.774
	B	-0.234	0.400
	C	0.168	0.533
	D	-0.027	0.922
	E	-0.482	0.059
2011	A	-0.445	0.084
	B	0.234	0.382
	C	-0.063	0.816
	D	-0.310	0.242
	E	0.177	0.511

Tabla 4: Resultados del test de correlación de Pearson entre las variables UFC/g suelo y $\mu\text{g } C_{\text{fúngico}}/\text{g } \text{suelo}$ para todos los tratamientos y ambos años de muestreo.

Discusión

Aplicando un método cultivo independiente directo, se estimó la biomasa fúngica total en un suelo de una región agrícola del SO bonaerense tratado con distintas dosis y combinaciones de glifosato y 2,4-D.

La técnica directa aquí empleada es muy reciente, por ello existen pocos trabajos que permitan realizar comparaciones *vis á vis*. En la Tabla 5 se presenta información de trabajos que empleando mayormente técnicas cultivo-independientes indirectas, expresan los valores de biomasa en unidades comparables.

Para el suelo control, los valores estimados de biomasa total estuvieron dentro del rango de los observados en otros suelos agrícolas, con similar o mayor contenido de materia orgánica (Scheu y Parkinson, 1994; Frey et al., 1999; Klein y Paschke, 2000; de Vries et al., 2006; van der Wal et al., 2006; de Vries et al., 2007; Aleixo et al., 2014).

Técnica	Biomasa estimada	Ambiente	g MO/kg suelo	Referencia
Tinción Calcoflúor	38 m hifas/g suelo	Bosque, Canadá	37	Scheu y Parkinson, 1994
Biomasa total	20 $\mu\text{gC}_{\text{fúngico}}$ /g suelo	Agrícola, Estados Unidos	12-23	Frey et al., 1999
	11,5 $\mu\text{gC}_{\text{fúngico}}$ /g suelo	Agrícola, Holanda	27	van der Wal et al., 2006
	25-38 $\mu\text{gC}_{\text{fúngico}}$ /g suelo	Agrícola, Holanda	52	de Vries et al., 2006
	25-37 $\mu\text{gC}_{\text{fúngico}}$ /g suelo	Agrícola, Brasil	13-22	Aleixo et al., 2014
	2,2-26,9 $\mu\text{gC}_{\text{fúngico}}$ /g suelo 8-42 m hifas /g suelo	Agrícola, Argentina	< 20	Vázquez, 2014 (Tesis, inéd.)
Contenido ergosterol	67-223 $\mu\text{gC}_{\text{fúngico}}$ /g suelo	Agrícola, Canadá	11-29	Montgomery et al., 2000
Fracción activa	500-1000 $\mu\text{gC}_{\text{fúngico}}$ /g suelo	Pastizal, Gran Bretaña	41	Zhao et al., 2005
Respiración	566-1143 $\mu\text{gC}_{\text{fúngico}}$ /g suelo	Agrícola, Washington	24-46	Bailey et al., 2002
Fracción activa				
Hidrólisis FDA	399-490 m hifas/g suelo	Bosque, Suecia	Elevado	Bååth y Söderström, 1982
Fracción activa	23 m hifas/g suelo	Agrícola abandonado, Estados Unidos	44,3	Klein y Paschke, 2000

Tabla 5: Revisión bibliográfica de la biomasa fúngica estimada aplicando diferentes metodologías. (FDA: fluoresceína di acetato; MO: Materia orgánica; HG: hongos).

Esto podría relacionarse con su historia de uso (sin tratamiento previo de labores). Para suelos tratados es esperable que la biomasa fúngica sea menor que en suelos prístinos, esperándose para regiones semiáridas valores de biomasa entre 2 y 10 m/g suelo y entre 39-140 m/g suelo, en suelos agrícolas y prístinos respectivamente (Scheu y Parkinson, 1994; Frey et al., 1999; van der Wal et al., 2006).

Los valores de biomasa en las parcelas tratadas con herbicidas fueron menores que los estimados para suelos agrícolas en otras regiones del mundo. En la Argentina, la biomasa fúngica fue estudiada en suelos tratados con glifosato pero empleando otras metodologías (FDA, contenido de ergosterol) no comparables a las de éste estudio (Aon y Colaneri, 2001; Aon et al., 2001; Gaspar et al., 2001; Bórtoli et al., 2012).

En ambos períodos, en el 3^{er} muestreo (ca. 2 semanas después de la aplicación), la biomasa del tratamiento control fue significativamente mayor que la estimada para algunos tratamientos (Temporada 2010 tratamiento A ≠ E, y 2011 tratamientos A ≠ B, C, D y E).

A su vez, luego de una semana de aplicados los herbicidas, los valores de biomasa estimados fueron en promedio mayores para las parcelas tratadas (B, C, D y E) que los del control. Esta tendencia podría atribuirse al efecto estimulante y transitorio del glifosato sobre la biomasa y la actividad de los microorganismos del suelo en general (Chakravarty y Chatarpaul, 1990; Busse et al., 2001; Ratcliff et al., 2006; Means et al., 2007; Zabaloy et al., 2008; Gómez et al., 2009; Kremer y

Means, 2009; Zabaloy et al., 2012), y sobre los hongos en particular (Busse et al., 2000; Aon et al., 2001; Araujo et al., 2003; Meriles et al., 2006; Ratcliff et al., 2006; Bórtoli et al., 2013). Aon et al. (2001) y Bórtoli et al. (2012).

En medio de cultivo sintético, Meriles et al. (2006) y Busse et al. (2001) demostraron que concentraciones de glifosato similares a las recomendadas para usar a campo son letales para los hongos. Sin embargo, en el suelo, tanto a campo como en medio de cultivo con éste, el glifosato no es tan tóxico, pues se une rápidamente a partículas como arcillas y materia orgánica, y ya no se encuentra libre para penetrar en las células de los microorganismos (Busse et al., 2001).

La complejidad metabólica de los hongos les permite utilizar diversas fuentes de carbono para su crecimiento, y el glifosato, no es una excepción. El contenido de carbono es un factor limitante para el crecimiento de los microorganismos en el suelo (Bridge y Spooner, 2001; Zabaloy et al., 2013). El incremento observado en la biomasa fúngica luego de la aplicación de glifosato podría estar relacionado con la utilización de éste como fuente de carbono, nitrógeno o fósforo como ha sido previamente observado en los trabajos de Krzyśko-Łupicka y Orlik (1997), Busse et al. (2000), Lipok et al. (2003) y Romero et al. (2004). Araujo et al. (2003) luego de incubar muestras de suelo tratadas con glifosato demostraron, por medio de cromatografía, la presencia de productos de degradación del glifosato, indicando la existencia de degradación fúngica.

En el capítulo 1 se mencionó la influencia de las condiciones climáticas sobre la actividad fúngica (Bååth y Söderström, 1982; Bardgett et al., 1999; Frey et al.,

1999; Boddy et al., 2013). Los cambios en la biomasa fúngica observados luego de la aplicación de los herbicidas pueden atribuirse a una combinación de variables. Por un lado la influencia de los tratamientos aplicados y por otra parte las variaciones en las condiciones climáticas. En concordancia con los resultados obtenidos en el capítulo 1, se observó un aumento en la biomasa fúngica. Aplicando una metodología cultivo independiente el aumento se observó luego de una semana de aplicados los herbicidas. La metodología empleada en el presente capítulo demostró mayor sensibilidad para detectar variaciones estadísticamente significativas en la biomasa, si bien las tendencias promedio observadas fueron similares aplicando ambos métodos.

Los coeficientes de correlación entre los valores de biomasa fúngica estimados aplicando dos metodologías diferentes (cultivo-dependiente vs. Cultivo-independiente) fueron no significativos. Si bien se partió de la mismas suspensiones de suelo para realizar tanto las estimaciones cultivo-dependientes como las cultivo-independientes las metodologías aplicadas presentan una sensibilidad diferencial frente a las distintas fracciones fúngicas (esporas, hifas). La técnica de diluciones seriadas para la estimación de UFC tiende a sobreestimar la fracción procedente de las esporas y otras estructuras de resistencia que quedan en la suspensión de suelo al realizar las diluciones (Alef y Nannipieri, 1995). Sin embargo, al aplicar la técnica de tinción de frotis de suelo, los valores de biomasa fúngica obtenidos están exclusivamente formados por la fracción de hifas en el suelo (Bloem et al., 2004). Ambas metodologías resultan complementarias para obtener una idea global del estado del sistema.

CAPITULO 3

Perfiles moleculares de las comunidades fúngicas: Electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante “EGGD”

Introducción

Una de las principales dificultades que presenta el estudio de los microorganismos del suelo, es que a pesar de ser potencialmente viables y metabólicamente activos, menos del 1 % son cultivables (Amann et al., 1995). Con la finalidad de superar esta limitación para representar la mayor proporción posible de la diversidad microbiana existente en una muestra ambiental se han desarrollado una serie de metodologías, que prescinden de pasos previos de cultivo (Amann et al., 1995; Head et al., 1998). Algunas de estas metodologías involucran la tinción directa de los microorganismos presentes en la muestra (mencionadas en el Capítulo 2). Otras metodologías se basan en técnicas moleculares, permitiendo obtener los perfiles genéticos de las comunidades microbianas.

El estudio de la diversidad microbiana en ambientes naturales ha avanzado enormemente a partir de la introducción de técnicas provenientes de la biología molecular. La aplicación de técnicas moleculares para el estudio de los microorganismos en ambientes naturales data de mediados de 1980 (Head et al., 1998) y desde entonces este enfoque metodológico ha influenciado de manera significativa el entendimiento de la diversidad y ecología microbiana. En particular, el campo de la ecología microbiana se ha beneficiado por un gran desarrollo de diversas técnicas que en los últimos 20 años han permitido estudiar no sólo la

identidad, sino también la actividad y la genómica microbiana (Anderson et al., 2003b; Jeewon y Hyde, 2007; Manter y Vivanco, 2007; Varma y Oelmüller, 2007).

Dentro de los métodos utilizados en este campo se han desarrollado diferentes tipos de técnicas que permiten obtener un “perfil genético” o “huella genética” de la comunidad. Estas metodologías aprovechan diferentes propiedades del material genético obtenido a partir de la muestra ambiental (i.e. longitud de secuencia, presencia o ausencia de sitios de restricción, comportamiento de desnaturalización) y permiten obtener una rápida visualización del ensamble microbiano, permitiendo así, analizar cambios espaciales y temporales dentro de la comunidad y facilitar la comparación entre diferentes comunidades. Entre los métodos de huella genética más utilizados podemos mencionar al Análisis de Polimorfismos de Longitud en Fragmentos Terminales de Restricción (T-RFLP: Terminal-Restriction Fragments Length Polymorphism) (Avaniss-Aghajani et al., 1994; Liu et al., 1997), PCR-Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (EGGD: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer et al., 1993 y 1998) y el Análisis Automatizado del Espacio Intergénico Ribosomal (ARISA: Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) (Fisher y Triplett, 1999; Kirk et al., 2004; Yannarell y Triplett, 2005; Nocker et al., 2007).

En los últimos años se han incorporado técnicas a gran escala como las metagenómicas, basadas en el análisis de fragmentos genómicos de microorganismos, y dentro de ellas, el uso de metodologías alternativas de secuenciación, como la pirosecuenciación, para el estudio más detallado de la diversidad de comunidades microbianas en ambientes naturales (Varma y

Oelmüller, 2007; Rascovan et al., 2013). La pirosecuenciación ribosomal, está basada en la secuenciación y el análisis de cientos de pequeños fragmentos de los genes 16S del ARNr, brinda una información muy detallada de la diversidad de las comunidades, ya que permite detectar y cuantificar tanto los miembros más abundantes de la comunidad como aquellos componentes minoritarios (Roesch et al., 2007; Lim et al., 2010; Rousk et al., 2010).

La biología molecular es una herramienta muy poderosa para el análisis de las comunidades de microorganismos de muestras ambientales y fundamentalmente, ha puesto en evidencia que la utilización de las técnicas tradicionales de cultivo microbiológico para el estudio de la diversidad microbiana deja fuera del análisis una fracción relevante de los microorganismos que habitan en los ambientes naturales (Staley y Konopka, 1985; Whitman y Coleman, 1998). En suelos agrícolas, se estima que menos del 0,1 % de los microorganismos presentes en el suelo pueden ser cultivados usando medios de cultivo comúnmente formulados (Hill et al., 2000) y con la aplicación de técnicas cultivo independientes se logra incluir en el análisis una mayor proporción de los microorganismos presentes en el suelo.

El uso de técnicas moleculares para el estudio de las comunidades de microorganismos del suelo depende de la extracción del ADN del mismo y la posterior caracterización de las secuencias aisladas (Varma y Oelmüller, 2007). Se han desarrollado varios protocolos para la extracción de ADN ambiental específicos para el tipo de muestra y organismos del cual se desea estudiar el material genético (Anderson et al., 2003a y b; Ranjard et al., 2003; Solaiman y Marschner, 2007).

Existen en el mercado kits de extracción, especialmente desarrollados para extraer el ADN microbiano de muestras provenientes de distintos ambientes (agua, suelo, aire, entre otros). Con ellos el proceso de extracción se simplifica y permite la manipulación de un gran número de muestras al mismo tiempo. Otra ventaja de los kits es la calidad y pureza de los productos de extracción obtenidos.

Luego de la extracción del ADN, para poder analizar el material genético extraído, se deben amplificar los fragmentos de interés aplicando la reacción en cadena de la polimerasa. Una limitación, relacionada con la extracción de material genético proveniente de muestras ambientales, radica en la presencia de ácidos húmicos o sustancias húmicas que son co-extraídas de la muestra de suelo con los ácidos nucleicos que pueden inhibir la actividad de la polimerasa durante la PCR (Tebbe y Vahjen, 1993; Pennanen et al., 2001; Anderson y Cairney, 2004). Para solucionar este inconveniente pueden emplearse productos aditivos de la PCR (Anderson y Cairney, 2004) o bien se pueden utilizar los kits comerciales que ya traen incorporados inhibidores de las sustancias húmicas.

La reacción en cadena de la polimerasa, ideada por el científico Kary Mullis a mediados de los 80's y más conocida con las siglas PCR (del inglés "Polymerase Chain Reaction"), ha cambiado el curso de las ciencias biológicas más que cualquier otra técnica inventada durante el siglo XX. El gran éxito científico de la PCR reside en que permite obtener *in vitro* un gran número de copias de fragmentos específicos de ADN, basándose en un principio muy sencillo: la utilización de mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del ADN durante la división celular. La reacción en cadena de la

polimerasa consiste en la repetición cíclica de tres etapas: desnaturalización, unión específica de los cebadores y extensión de la cadena de ADN a copiar. Después de cada ciclo se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia de ADN diana delimitada por la pareja de cebadores específicos.

El ADN ribosomal (ADNr) ha recibido especial atención en los trabajos relacionados con la sistemática fúngica ya que presenta características que permiten una fácil amplificación del mismo (Jeewon y Hyde, 2007). En los hongos filamentosos y las levaduras, el ADNr está organizado como unidades que se repiten una detrás de la otra en tándem, en la Figura 19 se puede ver una representación esquemática del mismo. Cada una de las unidades repetidas incluye tres genes de ADNr; una subunidad pequeña, gen 18S; una subunidad grande, gen 28S; y el gen 5.8S el más pequeño de los tres, ubicado entre los genes 18S y 28S. En cada unidad los genes están separados por dos secuencias espaciadoras internas que se transcriben junto a los genes de ADNr llamadas ITS1 e ITS2. Aunque estas secuencias espaciadoras se transcriben junto con los genes, son secuencias no codificantes. El tamaño de las secuencias ITS varía entre 200 y 400 pares de bases. A su vez cada una de las unidades de ADNr se encuentra separada de la siguiente unidad por una secuencia espaciadora intergénica. El gen más pequeño del ADNr es el 5S y puede o no estar incluido en la unidad del ADNr.

La tasa de evolución de las tres regiones que componen las múltiples copias del ADNr (18S, 28S y 5.8S) es diferente, y esto ha permitido a los investigadores reconstruir la filogenia de los distintos grupos taxonómicos estudiando las variaciones en las regiones del ADNr. La subunidad pequeña (SSU) 18S ADNr, es

una región muy conservada, con tasas de evolución muy lenta y gracias a esto puede ser utilizada para establecer relaciones filogenéticas a nivel de orden o familia (Jeewon y Hyde, 2007). El gen 28S o subunidad grande (LSU) del ADNr presenta tasas moderadas de variación, suficientes para estudiar relaciones a nivel de género.

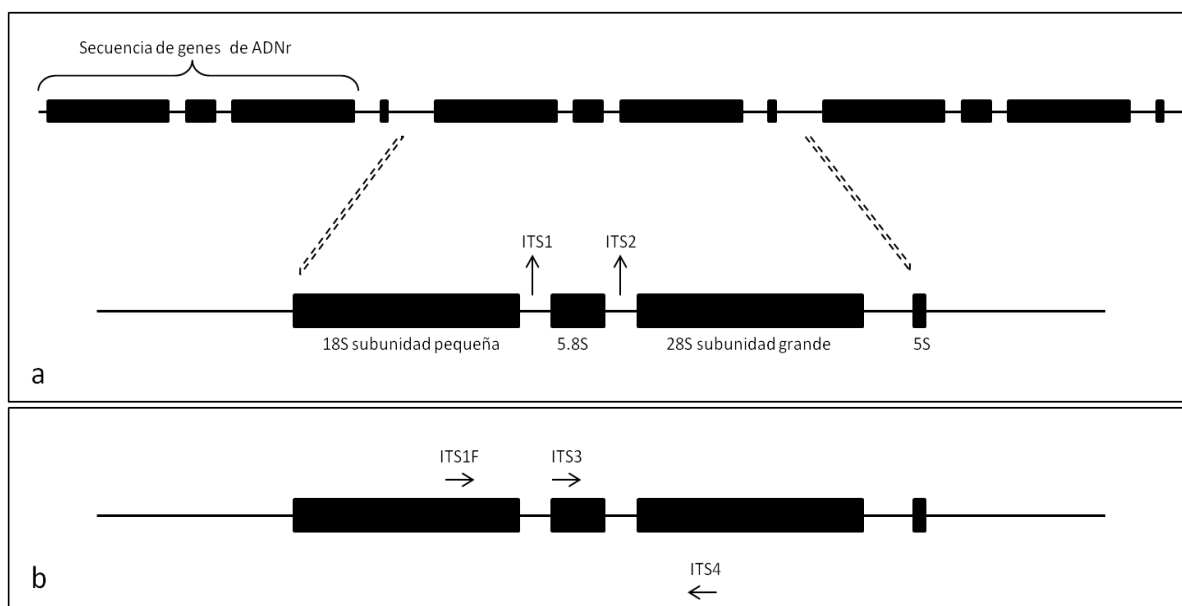


Figura 19: Representación esquemática del ADNr: a) secuencia en tándem de los genes del ADNr (18S, 5.8S, 28S y 5S) y los espaciadores intergénicos ITS; b) regiones donde se acoplan los cebadores comúnmente usados ITS1F, ITS3 e ITS4.

Las regiones no codificantes del ADNr (ITS1, ITS2 e IGS) presentan tasas de evolución mucho mayores y permiten ser utilizadas para comparar especies fúngicas hasta un nivel inter-específico (Gardes y Bruns, 1993; Jeewon y Hyde, 2007). Estas regiones son las más susceptibles a acumular mutaciones y por lo tanto tienen un gran interés en el estudio, tipificación e identificación de especies fúngicas (Gardes y Bruns, 1993).

Mucho han avanzado las investigaciones en la búsqueda de cebadores específicos con los cuales se pueda amplificar la mayor proporción del ADN fúngico

extraído de la muestra, sin amplificar la fracción correspondiente a especies eucariotas no fúngicas (Anderson 2003a; Anderson y Cairney, 2004). Gardes y Bruns (1993) diseñaron un par de cebadores capaces de amplificar específicamente las regiones ITS fúngicas sin amplificar simultáneamente el genoma de plantas u otros organismos eucariotas. La creciente disponibilidad de cebadores específicos así como el desarrollo de equipos y reactivos que permiten una síntesis rápida y económica de los mismos ha sido un factor clave para la expansión del uso de PCR en muestras ambientales (Watson y Blackwell, 2000).

El uso combinado de la PCR con otras técnicas complementarias como EGGD (en inglés DGGE, “Desnaturalization Gradient Gel Electrophoresis”), ha hecho posible el estudio de las comunidades de organismos presentes en una muestra. El sistema PCR-EGGD es una de las técnicas más utilizadas para la investigación de las comunidades microbianas a partir de muestras ambientales complejas (Jeewon y Hyde, 2007). En relación a los hongos, se han usado mucho y se ha corroborado que las regiones ITS son eficaces para este tipo de comunidades (Anderson, 2003a).

La técnica de EGGD, se basa en la separación de fragmentos de ADN cuya longitud es similar pero que difieren en su secuencia. El EGGD nos permite diferenciar distintos organismos mediante el análisis de patrones de bandas, derivados de la apertura de la doble hélice de sus respectivos ADNs en un gradiente desnaturalizante. La dos hebras de la molécula de ADN se separan (“Melting”) cuando calor o algún agente químico desnaturalizante es aplicado sobre ellas. La separación de las dos hebras de ADN está influenciada por dos factores:

La cantidad de pares de bases GC con respecto a las AT así como también la atracción con bases nitrogenadas cercanas. Como consecuencia de esto una molécula de ADN tiene diversos dominios con diferentes puntos de Melting. Para evitar la separación completa de las moléculas de ADN estudiadas al aplicar el gradiente desnaturizante, durante la amplificación se utiliza uno de los cebadores con una secuencia artificial rica en GC añadida en posición 5', esto evita la desnaturalización completa de la molécula de ADN (Muyzer et al., 1993).

Una ventaja de la técnica del EGGD, con respecto a otras técnicas de “huella genética” es que permite la escisión del gel de las bandas de interés (i.e. aquellas que distinguen a la comunidad) y su posterior purificación para la identificación a través de su secuenciación (Muyzer et al., 1993; Muyzer y Smalla, 1998). Esta metodología tiene el potencial de detectar diferencias en el comportamiento de desnaturalización de pequeños fragmentos de ADN cuyas secuencias difieren, en teoría, en apenas un par de bases. En consecuencia, esta técnica ha resultado particularmente útil para la identificación de los miembros dominantes en la comunidad (Lindström y Leskinen, 2002). Las bandas individuales representan aquellas secuencias que han frenado su migración a una altura específica del gel al desnaturizarse, de modo que, idealmente, cada banda correspondería a una especie diferente.

La primera aproximación que permite comenzar a dilucidar la estructura y funcionamiento de una comunidad consiste en la búsqueda de patrones, es decir, de aquellas similitudes o tendencias repetidas a lo largo de diferentes gradientes ambientales (i.e. manejos del suelo, aplicaciones de agroquímicos). El análisis

comparativo de regiones conservadas del ADN nos permite estudiar la diversidad biológica presente en determinado ambiente y de esta manera encontrar similitudes, patrones o tendencias a lo largo de las distintas muestras de suelo. El reconocimiento de estos patrones resulta fundamental para la formulación y puesta a prueba de hipótesis sobre el impacto que la aplicación de distintos herbicidas tiene en las comunidades fúngicas del suelo.

La mayor parte de las investigaciones en relación al estudio de las comunidades fúngicas de suelos agrícolas tienen como objetivo el detectar el efecto de diferentes prácticas agrícolas de manejo sobre las poblaciones de hongos del suelo (Klingen et al., 2002; Klamer y Hedlund, 2004; Meyling y Eilenberg, 2006; Vargas Gil et al., 2011). En nuestro país, aún no hay muchos antecedentes en lo que se refiere al análisis de las comunidades fúngicas de suelos agrícolas utilizando el sistema PCR-EGGD. Vargas Gil et al. (2011) observaron diferentes perfiles moleculares para la comunidad fúngica en suelos sometidos a distintos sistemas de labranza en suelos cultivados con soja. Moreno et al. (2014) realizaron una caracterización preliminar de los hongos en suelos de la provincia de La Rioja. Montecchia et al. (2011) trabajaron con comunidades microbianas de suelos agrícolas del noroeste de la Argentina, puntualizando su trabajo en las comunidades bacterianas de los suelos.

En este capítulo se aplicaron técnicas moleculares con el objetivo de estudiar el impacto que distintas combinaciones y dosis de herbicidas producen en las comunidades fúngicas de un suelo de una región agrícola del SO de la provincia de Buenos Aires.

Materiales y Métodos

Las muestras de suelo utilizadas fueron conservadas a -20 °C (Cui et al., 2014). Las mismas fueron acondicionadas antes de hacer la extracción de ADN. Se les realizó un ciclo de descongelamiento rápido de 24 horas a 20 °C (Paetz y Wilke, 2005). Se realizaron muestras mixtas, con las muestras tomadas de cada bloque para cada fecha de muestreo, obteniendo un total de 40 muestras. Se mezcló la muestra mixta y se tomó una sub muestra de cada una para extraer el ADN. En la Tabla 6 se muestra un esquema de la secuencia de pasos realizados para la obtención de los perfiles de EGGD.

1.	Toma de muestras
2.	Extracción ADN
3.	Amplificación ADNr (18S e ITS) usando PRC y cebadores específicos
4.	Electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (preparación, siembra y corrida)
5.	Tinción geles con soluciones de plata

Tabla 6: Secuencia pasos EGGD

Extracción del ADN

El ADN se extrajo a partir de 0,25 g de suelo (Figura 20), usando el kit comercial, PowerSoil™ DNA Isolation kit (MO BIO Laboratories inc.). Se hicieron algunas modificaciones al protocolo de extracción propuesto por los fabricantes. El ADN extraído se conservó a -20 °C hasta su utilización para las reacciones de amplificación.

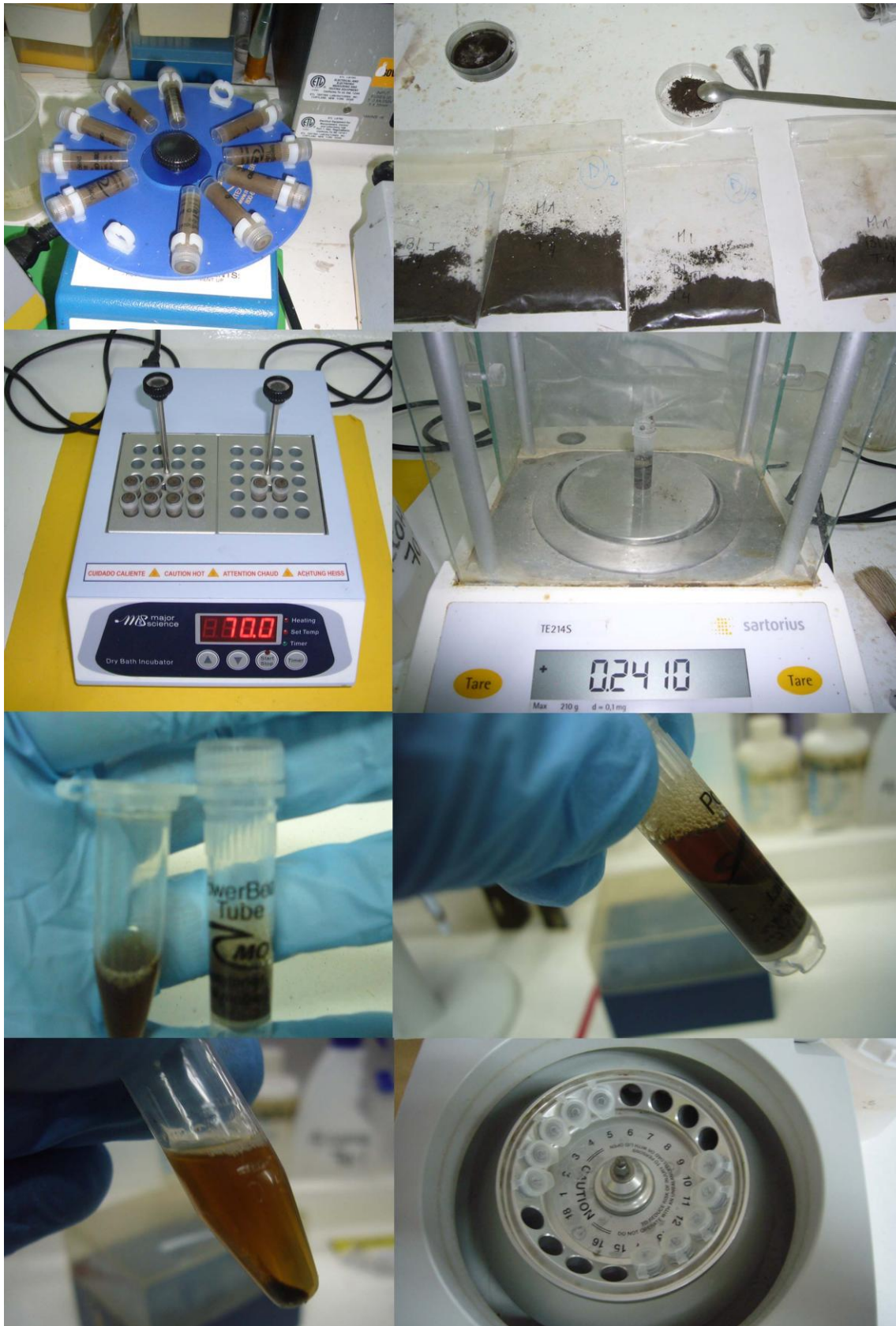


Figura 20: Extracción de ADN utilizando el kit Power Soil™ DNA isolation Kit (MO BIO, Lab.Inc.)

Análisis de calidad y cuantificación del ADN extraído

Una vez extraído el ADN, se realizó el análisis de calidad y se cuantificó el producto de extracción. La calidad del ADN se analizó por medio de su separación por electroforesis en geles de agarosa al 0,7 %. Se cuantificó fluorométricamente la cantidad de ADN extraído usando el fluorómetro Qubit[®] de Invitrogen. Se siguió el protocolo de cuantificación propuesto por los fabricantes.

El gel de calidad de Agarosa 0.7 % se preparó con 10 ml de TBE 5x (0,54 g de Tris base; 0,275 g de ácido bórico; 0,2 µl de EDTA, pH=8), 40 ml de agua bi-distilada, 0,35 g de agarosa; se calentó 1 minuto en microondas y finalmente se agregaron 3 µl de Gel Red (Genbiotech). Se homogeneizó y se colocó en el soporte con el peine colocado. Se dejó solidificar 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez que el gel solidificó, se llenó la cuba de electroforesis con solución buffer de corrida (TBE 5x) y se colocó el gel dentro de la cuba. Una vez dentro de la cuba el gel se sembró con 5-8 µl de muestra de ADN con 2 µl de Azul de Bromo Fenol-Sacarosa. Se conectó la cuba a la fuente de poder y se corrió el gel durante aproximadamente 15-30 minutos a una intensidad de 80 mA. Una vez terminada la electroforesis, los geles se visualizaron en transiluminador UV (Figura 21).

Soluciones

- Tris Borato EDTA: TBE 5X

Tris 27,5 g

Borato	54 g
EDTA 0,5M pH=8	20 ml
H ₂ O _{dest}	Cantidad necesaria para llevar a 1 l la solución

- Solución TBE

TBE 5X	20 ml
H ₂ O _{dest}	80 ml

-Buffer de corrida

TBE 5X	150 ml
H ₂ O _{dest}	550 ml

- Azul de Bromo Fenol-Sacarosa: se usa como buffer de carga para la siembra de los geles, se almacena en el freezer a -20 °C.

Azul de bromofenol	0,25 g
Sacarosa	40 g
H ₂ O _{dest}	100 ml



Figura 21: Preparación, siembra y corrida de Geles de Agarosa 0,7 % y 1,5 %.

Amplificación del ADN extraído

La amplificación del ADN fúngico se realizó probando dos pares de cebadores diferentes Tabla 7 (Anderson 2003a). Se probaron distintos volúmenes de ADN molde inicial, entre 1-16 μ l, para lograr amplificar el ADN fúngico extraído de todas las muestras. Se probó el par de cebadores ITS1F/ITS4 seguido de una segunda amplificación con el par de cebadores ITS3-GC/ITS4, y también se probó el par de cebadores EF4/ITS4 seguido de amplificación con el par ITS1F-GC/ITS2. Los productos de PCR resultantes se conservaron a -20 °C hasta su posterior utilización.

Par de Cebadores	Región amplificada	Secuencia cebador (5' - 3')	Tamaño amplicón Peso \approx (pb)	Referencia
ITS1F	ITS	CTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	450-750	White et al. (1990) Gardes y Bruns (1993)
ITS4		TCCTCCGCTTATTGATATGC		
ITS3-GC	ITS	CGCCCGCCGCGCCCGCGCC CGTCCCGCCGCCCCGCCCG GCATCGATGAAGAACGCAGC	200	White et al. (1990) Gardes y Bruns (1993)
ITS4		TCCTCCGCTTATTGATATGC		
EF4	18S ADNr	GGAAGGRTGTATTTATTAG	1000	Smit et al. (1999) Gardes y Bruns (1993)
ITS4		TCCTCCGCTTATTGATATGC		
ITS1F-GC	ITS	CGCCCGCCGCGCCCGCGCC CGTCCCGCCGCCCCGCCCG TCCGTAGGTGAACCTGCGG	200-300	White et al. (1990)
ITS2		GCTGCGTTCTTCATCGATGC		

Tabla 7: Pares de cebadores utilizados

a) Amplificación usando el par de cebadores ITS1F/ITS4, seguida de amplificación con el par de cebadores ITS3-GC/ITS4.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μl , formado por \approx 1-16 μl de templado de ADN ($20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$), 0,5 μl dNTPs (5 mM), 0,5 μl de cada cebador (ITS1F e ITS4, 50 μM), 2,5 μl Cl_2Mg (2,5 mM), 2,5 μl Buffer (10x), 2,3-17,3 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ estéril y 0,2 μl Taq Polimerasa (1U). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador XP Cycler. La secuencia del termociclador se inició con una desnaturalización de 3 minutos a 95 °C, seguido por 25 ciclos que consistieron en: desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, hibridización a 46 °C por 1 minuto y elongación a 72 °C por 2 minutos. Finalmente, se realizó un ciclo final de elongación a 72 °C por 10 minutos.

El producto de reacción se corroboró en geles de Agarosa 1,5 % que se preparó con 20 ml de TBE 5x (0,54 g de Tris base; 0,275 g de ácido bórico; 0,2 μl de EDTA, pH=8), 80 ml de agua bi-distilada, 1,5 g de agarosa; se calentó 1 minuto en microondas y finalmente se agregaron 3 μl de Gel Red (Genbiotech). Se homogenizó y se colocó en el soporte con el peine colocado. Se dejó solidificar 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez que el gel solidificó, se llenó la cuba de electroforesis con solución buffer de corrida (TBE 5x) y se colocó el gel dentro de la cuba. Una vez dentro de la cuba el gel se sembró con 10 μl de producto de reacción con 2 μl de Azul de Bromo Fenol-Sacarosa. En el gel también se sembraron 3 μl de marcador de peso molecular también, y los controles positivo y negativo. El gel se corrió 60 minutos a una intensidad de 80 mA. Una vez terminada la electroforesis, los geles se visualizaron en transiluminador UV. Una vez que se observaron las bandas en el gel de corrida, se prepararon las reacciones de reamplificación con el segundo par de cebadores.

Las segundas reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μl , formado por ≈ 1 μl de producto de amplificación, 0,5 μl dNTPs (5 mM), 0,5 μl de cada cebador (ITS3-GC e ITS4, 50 μM), 2,5 μl Cl_2Mg (2,5 mM), 2,5 μl Buffer (10x), 17,3 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ estéril y 0,2 μl Taq Polimerasa (1U). La secuencia del termociclador se inició con una desnaturalización de 3 minutos a 95 $^{\circ}\text{C}$, seguido por 25 ciclos que consistieron en: desnaturalización a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, hibridización a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto y elongación a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos. Finalmente, se realizó un ciclo final de elongación a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. El producto se corroboró en gel de corrida de Agarosa 1.5 %, igual a la anterior. Una vez que se observaron las bandas en los geles de corrida, se reservaron los productos de las segundas amplificaciones a -20 $^{\circ}\text{C}$, para ser sembrados en el gel de EGGD.

b) Amplificación usando los cebadores EF4/ITS4 escalonado con una segunda amplificación usando el par de cebadores ITS1F-GC/ITS2.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μl , formado por ≈ 1 -16 μl de templado de ADN (20 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$), 0,5 μl dNTPs (5 mM), 0,5 μl de cada cebador (EF4 e ITS4, 50 μM), 2,5 μl Cl_2Mg (2,5 mM), 2,5 μl Buffer (10x), 2.3-17,3 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ estéril y 0,2 μl Taq Polimerasa (1U). La secuencia del termociclador fue idéntica a las utilizadas previamente, solo varió la temperatura de hibridización, en este caso se aplicaron 44 $^{\circ}\text{C}$. El producto de reacción se corroboró en gel de corrida de Agarosa 1,5 % y en el caso de observares banda se realizaron las segundas reacciones utilizando el par de cebadores ITS1F-GC/ITS2.

Las segundas reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ l, formado por \approx 1 μ l de producto de amplificación, 0,5 μ l dNTPs (5 mM), 0,5 μ l de cada cebador (ITS1F-GC e ITS2, 50 μ M), 2,5 μ l Cl_2Mg (2,5 mM), 2,5 μ l Buffer (10x), 17,3 μ l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ estéril y 0,2 μ l Taq Polimerasa (1U). La secuencia del termociclador fue idéntica a las utilizadas previamente, solo varió solo varió la temperatura de hibridización, en este caso se aplicaron 50 °C. El producto de la segunda amplificación se corroboró en gel de corrida de Agarosa 1,5 %. Una vez que se observaron las bandas en los geles de corrida, se reservaron los productos de las segundas amplificaciones a -20 °C, para ser sembrados en el gel de EGGD.

Electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (EGGD)

Para la obtención de los perfiles moleculares a partir de los productos de las segundas amplificaciones se analizaron utilizando la técnica de EGGD con un gradiente lineal desnaturalizante 10-50% urea-formamida. El equipo utilizado fue VS20-DGGE fabricado por Cleaver Scientific Ltd. Para la realización del EGGD, Figura 22 primero se preparó el gel, luego se sembraron los productos de reamplificación y se corrió el gel durante 6 horas a 70 V, y a una temperatura de 60 °C. Luego se tiñeron los geles para lograr la visualización de las bandas. Ver **ANEXO 1: Preparación, siembra, corrida y tinción del gel de EGGD.**

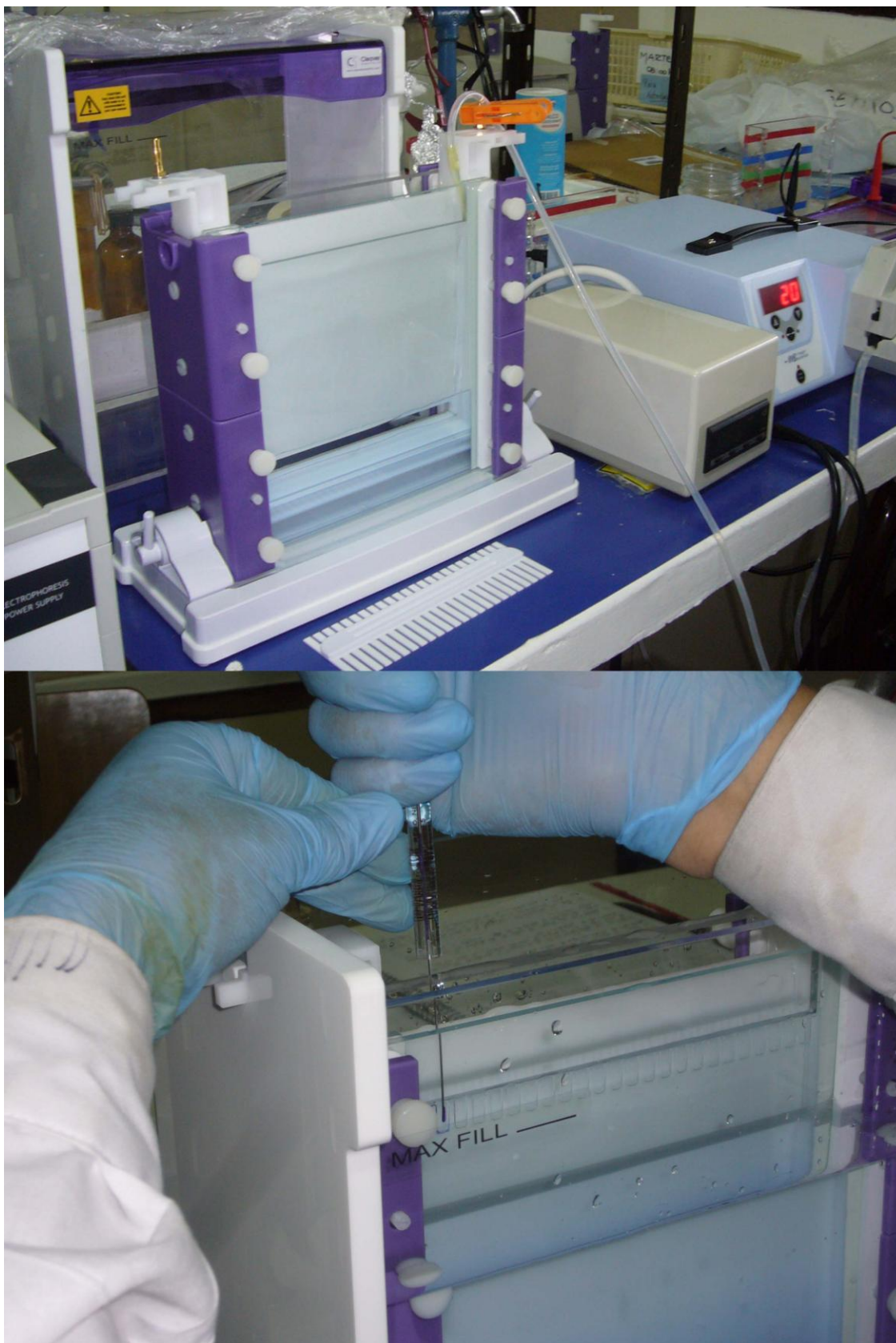


Figura 22: Preparación y siembra de gel EGGD.

Una vez que los geles estuvieron secos se analizó el patrón de bandas de los mismos. Los geles se tiñeron con plata y se escanearon para analizarlos con un software (Total Lab.). Se registraron todas las bandas y sus posiciones relativas en el gel, con esa información se construyó un patrón de bandas único a partir de todas las muestras, para poder comparar las bandas presentes en las calles (muestras) de diferentes geles. Se asumió que el número de bandas se corresponde con el número de miembros predominantes de la comunidad fúngica del suelo para cada muestra (Muyzer y Smalla, 1998; O'Callaghan et al., 2006; Jeewon y Hyde, 2007). El número de bandas por carril fue utilizado para estimar la riqueza específica de la muestra (S).

A partir del análisis de los patrones de bandas de los perfiles de EGGD se construyó una matriz binaria cualitativa basada en la presencia-ausencia de bandas para cada muestra. La matriz se exportó a una planilla de Microsoft EXCEL para continuar con el análisis numérico.

Se realizó un análisis de similitud entre las muestras, a partir de los patrones de bandas obtenidos. Cada banda se codificó a doble estado (0: ausencia y 1: presencia). Se generó una matriz binaria utilizando el coeficiente de Jaccard (Sneath y Sokal, 1973). Este coeficiente pondera doblemente la presencia de características coincidentes permitiendo una mejor diferenciación de muestras de baja similaridad. Los valores del coeficiente de Jaccard varían entre 0 (mínima similitud) y 1 (máxima similitud).

$$\text{Coeficiente de Jaccard} = \frac{a}{a + b + c}$$

Donde $a(1,1)$, es el número de caracteres en los cuales el mismo estado es compartido por los muestras; $b(1,0)$, es el número de caracteres presente para una muestra x y ausente para una muestra y ; y $c(0,1)$ es el número de caracteres ausente para una muestra x y presente para una muestra y . Se representaron gráficamente mediante un dendrograma que se construyó mediante el método UPGMA (agrupamiento promedio no ponderado de las medias aritméticas) con el paquete estadístico NTSYS 2.1 (Rohlf, 1998).

Resultados

La concentración de ADN microbiano total extraído de las muestras varió entre 5,08 y 7,75 ng μl^{-1} . Se logró extraer el ADN microbiano total de todas las muestras de suelo y los productos de las extracciones se corroboraron en geles de agarosa 0,7 % (Figura 23).

De todas las cantidades de ADN molde testeadas para poner a punto las amplificaciones, el volumen que mejores amplificaciones generó fue 5 μl extracto de ADN. Las reacciones realizadas con 16 μl de ADN molde amplificaron correctamente, pero no lograron migrar correctamente en el gel de corrida, quedando las bandas estancadas en la parte superior del gel. Las reacciones realizadas con 1 μl de ADN molde al correr en el gel de Agarosa 1,5 % mostraron bandas muy tenues.

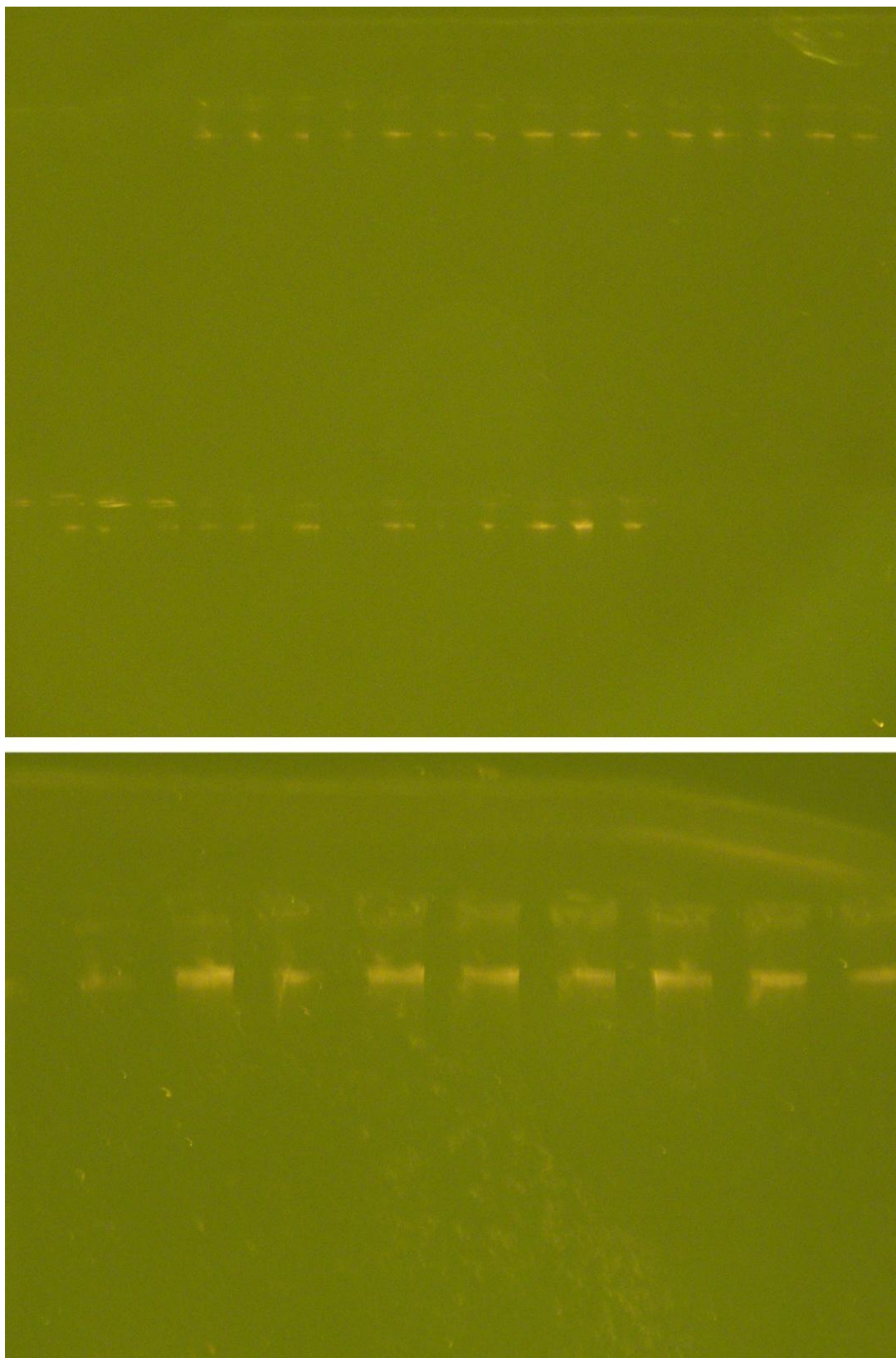


Figura 23: Geles de calidad Agarosa 0.7 %. Se ve la presencia de banda en todas las calles, mostrando que la extracción fue exitosa.

Al observar en los geles de corrida (Figura 24) las bandas generadas a partir de las amplificaciones realizadas a partir de 5 µl de extracto de ADN y compararlas con el marcador de peso molecular, podemos asegurar que las efectivamente bandas corresponden al producto de amplificación con un tamaño aproximado entre 400–750 pb. y 1000 pb. obtenidos con los de cebadores ITS1F/ITS4 e EF4/ITS4, respectivamente. Se puso a punto la reacción y 5 µl de extracto de ADN fue la cantidad necesaria para obtener resultados positivos en las reacciones de amplificación. Si bien se logró extraer ADN a partir de todas las muestras de suelo, no fue posible amplificar el ADN extraído en todos los casos, quedando las muestras de suelo M6, M11, M12 y M13 sin amplificar.

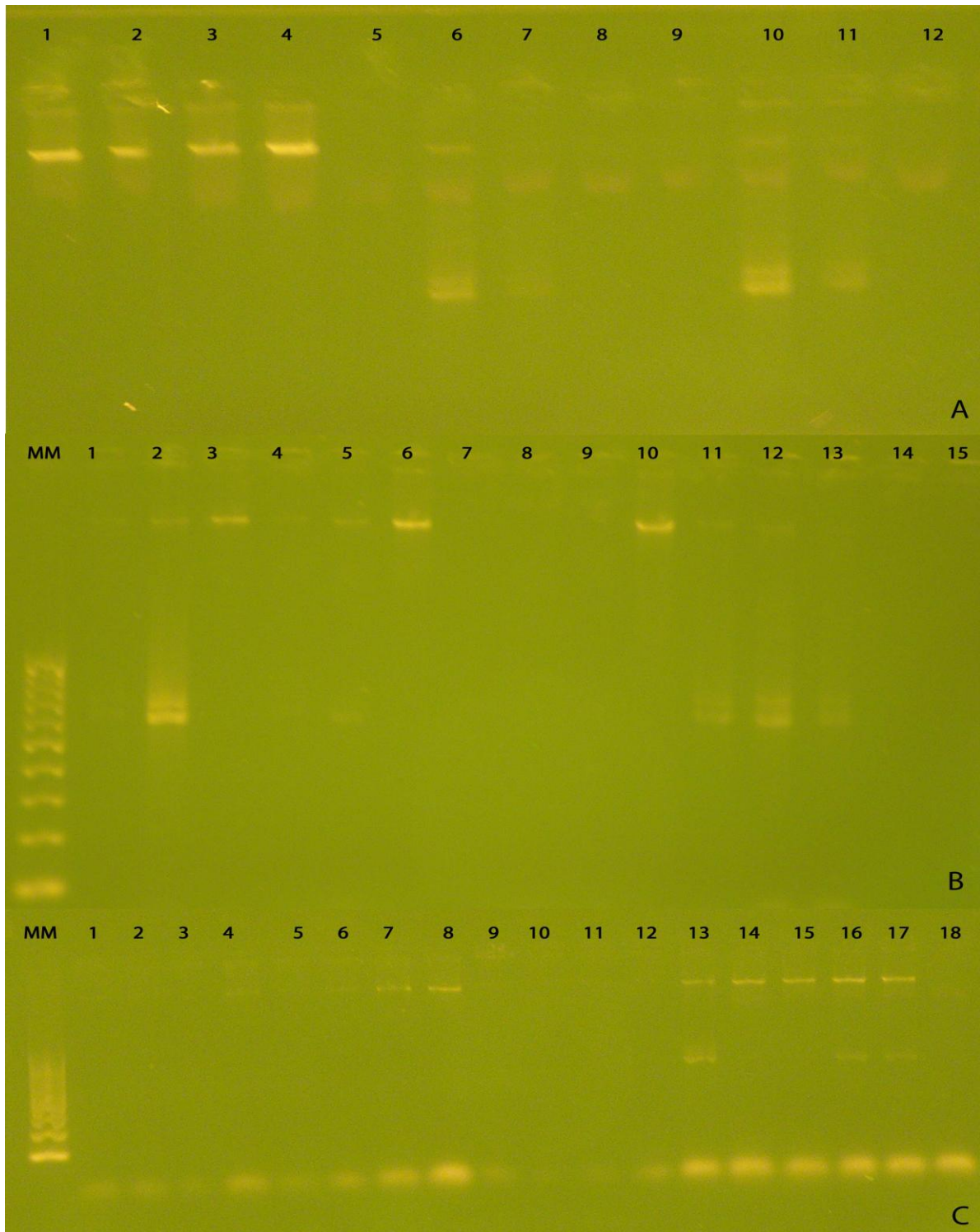


Figura 24: Geles de Corrida de Agarosa 1.5 %, utilizando los cebadores ITS1F/ITS4. A) calles 1-4 reacciones con 16 μ l ADN; calles 6-10 reacciones con 1 μ l ADN, calles 5 y 12 control (-), calle 11 control (+). B) calle 1 y 4 reacciones con 1 μ l ADN, calles 2 y 5 reacciones con 5 μ l ADN, calles 3 y 6 reacciones con 10 μ l ADN, calles 7-9 control (-), calle 10 reacción con 16 μ l ADN, calle 11 reacciones con 1 μ l ADN, calles 12 y 13 control (+). C) reacciones con 5 μ l ADN, calle 11 control (+), calles 12 y 18 control (-). MM: marcador de peso molecular.

Los dos grupos de cebadores probados amplificaron correctamente el ADN molde. Al hacer correr los productos de las segundas reacciones en los geles de EGGD, las amplificaciones realizadas con el conjunto EF4/ITS4 seguido por ITS1F-GC/ITS2 se obtuvieron mayor número de bandas y por lo tanto más nivel de polimorfismo que el detectado con los cebadores ITS1F/ITS4 seguido por ITS3-GC/ITS4. Todas las reacciones de amplificaciones subsiguientes se realizaron con el par de cebadores EF4/ITS4 seguido de amplificación con ITS1F-GC/ITS2.

Los perfiles de EGGD obtenidos a partir de los cebadores, EF4/ITS4 e ITS1F-GC/ITS2, de todas las muestras revelaron un total de 40 bandas o polimorfismos ubicados en distintas posiciones de los geles. En las Figura 25 y Figura 26, puede observarse los geles de EGGD, mostrando los patrones de bandas presentes en cada muestra. En general, se encontró un patrón de bandas dominantes dividido en dos sectores, un grupo en la parte superior del gel, que podría indicar un bajo contenido GC, y otro grupo de bandas en la parte central del gel. Además, se encontraron algunas bandas menores adicionales, propias de determinadas muestras.

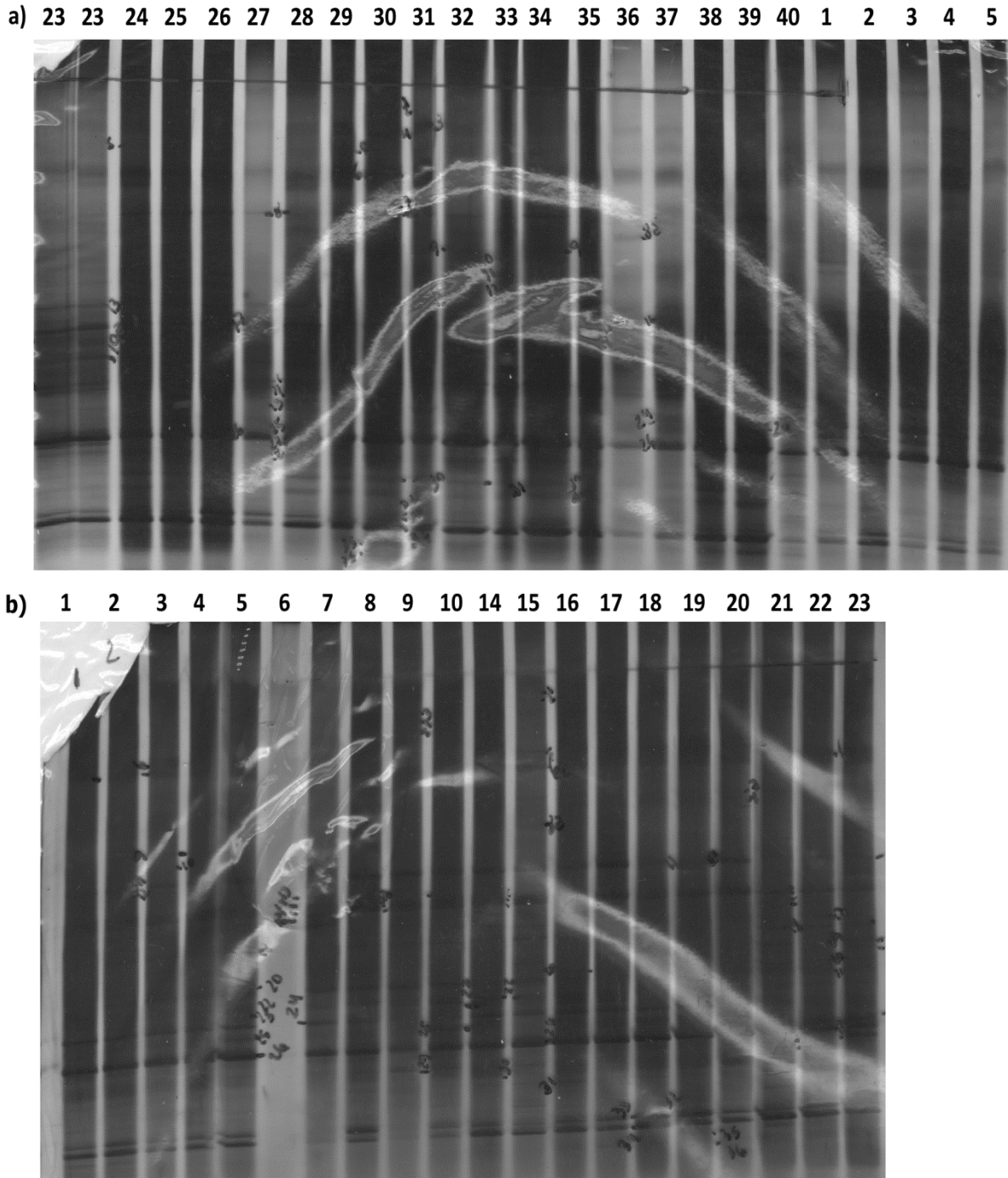
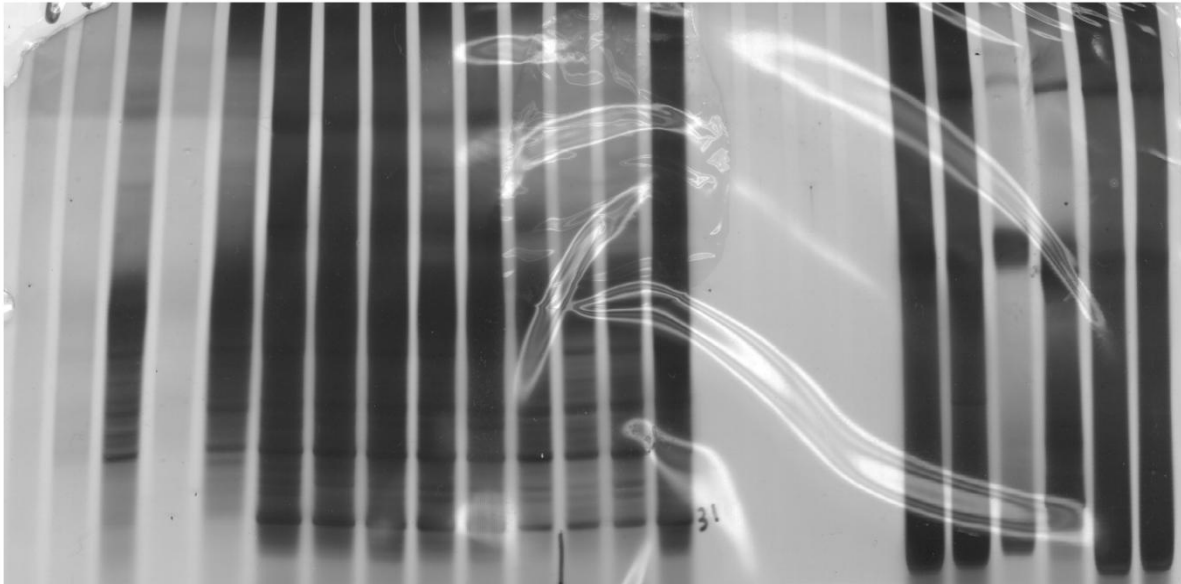


Figura 25: Visualización del perfil de bandas generado utilizando EGGD (10-50% de formamida:urea) para los productos de amplificación de las secuencias del gen 18S rDNA a partir de las amplificaciones con los cebadores EF4/ITS4 e ITS1F/ITS2. Arriba de cada calle del gel se indica el número de muestras a partir de la que se obtuvo cada perfil.

a) 6 6 7 9 32 33 34 35 36 37 38 39 40 13 14 15 16 17 18



b) 6 7 8 10 14 15 16 17 18 19 20 21 23 24 25 27 26 26 31 29 29 30

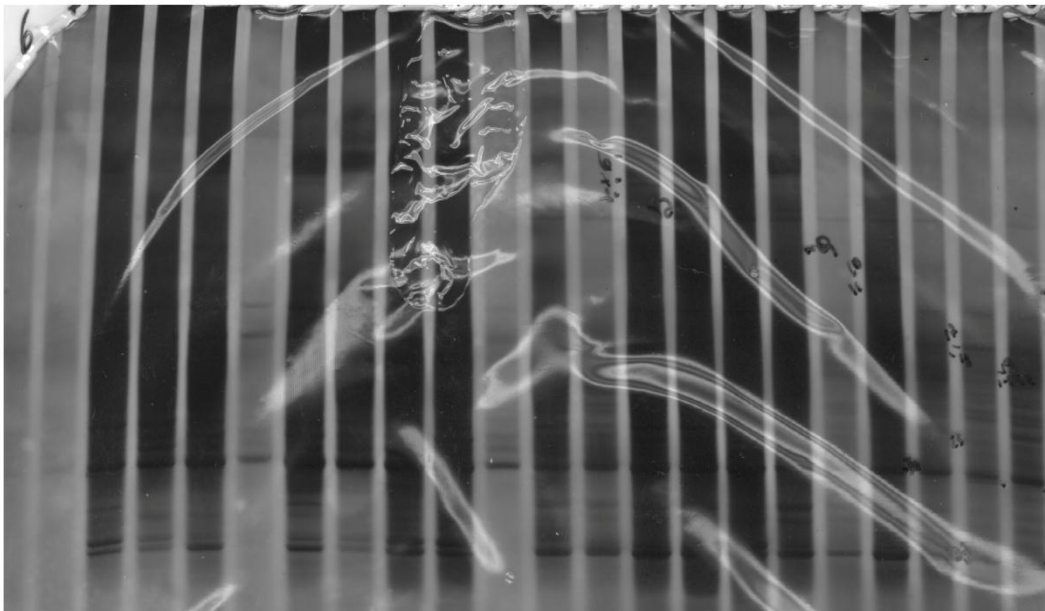


Figura 26: Visualización del perfil de bandas generado utilizando EGGD (10-50% de formamida:urea) para los productos de amplificación de las secuencias del gen 18S rDNA a partir de las amplificaciones con los cebadores EF4/ITS4 e ITS1F/ITS2. Arriba de cada calle del gel se indica el número de muestras a partir de la que se obtuvo cada perfil.

A partir de la visualización de los gels, se construyó la Figura 27, para una mejor interpretación visual de los polimorfismos. Los valores de riqueza específica

(polimorfismos) para las muestras, variaron entre 8 y 25 bandas. Al analizar los patrones de bandas de cada muestra, podemos encontrar que el 25 % del total de bandas reveladas, 10 bandas, no han sido recuperadas en los tratamientos control. Las bandas que nunca se encontraron en los controles son: A1, A2, A3, A4, A5, A6A, A9, A10, A12, A32.

En la Figura 27 se muestran los patrones de bandas agrupados por tratamientos. Algunas bandas muestran una presencia casi generalizada dentro de los perfiles de EGGD a lo largo de los dos años de ensayo. Estas bandas son A6, A26, A31, A33 y A34. Otras bandas muestran una clara estacionalidad apareciendo principalmente en los perfiles correspondientes al año 2010, estas bandas son: A11, A14, A15. En tanto que las bandas A10, A13, A22 aparecen, salvo alguna excepción, en los perfiles de las muestras provenientes del año 2011. Se puede ver que los tratamientos en los cuáles se ha aplicado una dosis doble de glifosato, solo o en combinación con 2,4-D, hay dos bandas propias, la A1 y A2. A su vez, las bandas A3, A4 y A5 solo aparecieron una vez, en muestras provenientes de suelos tratados con una combinación de glifosato y 2,4-D en dosis simples. La banda A6A solamente apareció en una ocasión, en una muestra proveniente del tratamiento glifosato 2x en combinación con 2,4-D.

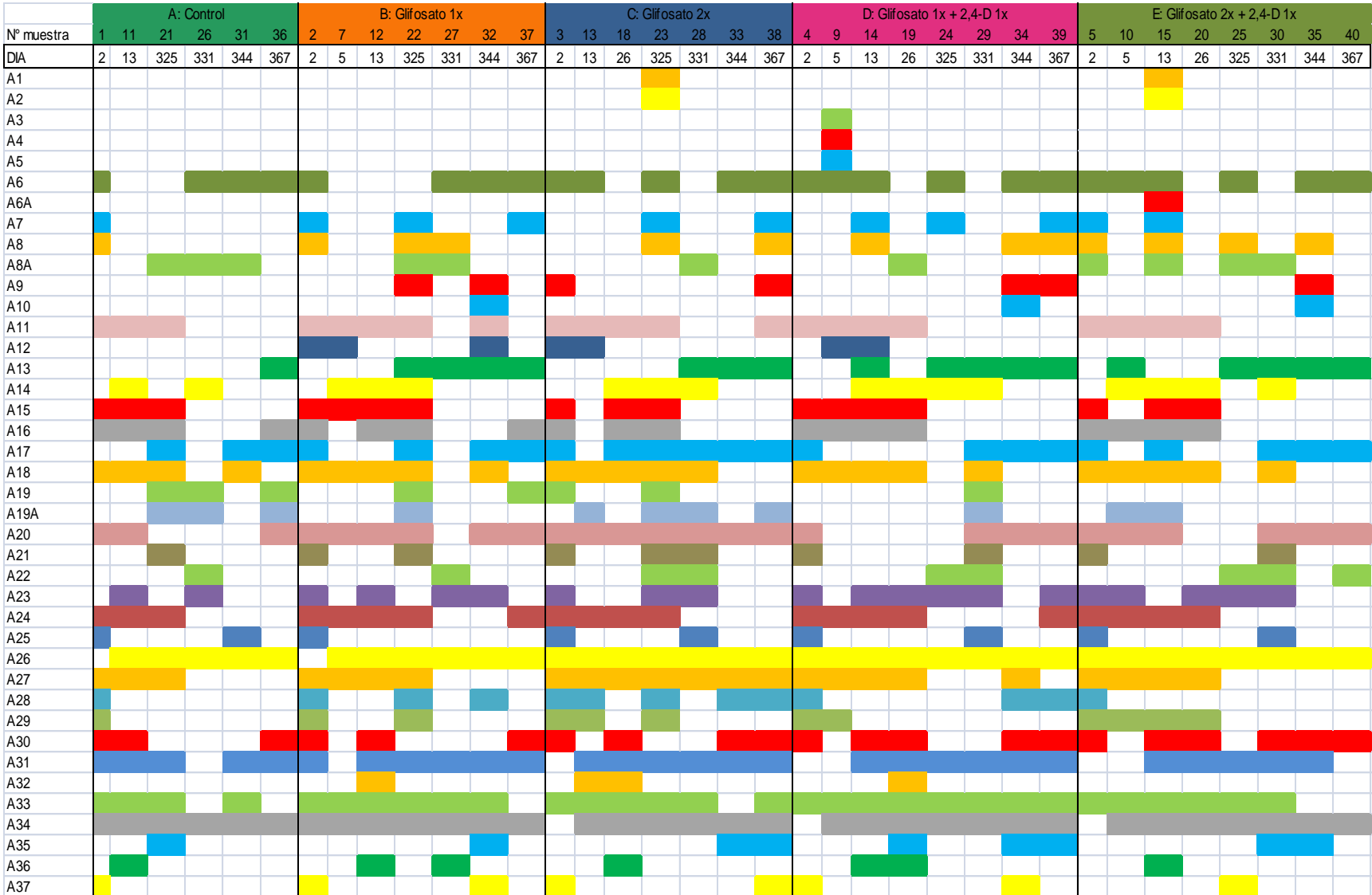


Figura 27: Matriz de presencia-ausencia de bandas generada a partir de los análisis de los gels de EGGD. Las muestras se presentan agrupadas según el tratamiento al que fueron sometidas (A, B, C, D ó E) y a su vez están ordenadas en relación al día en que fueron colectadas.

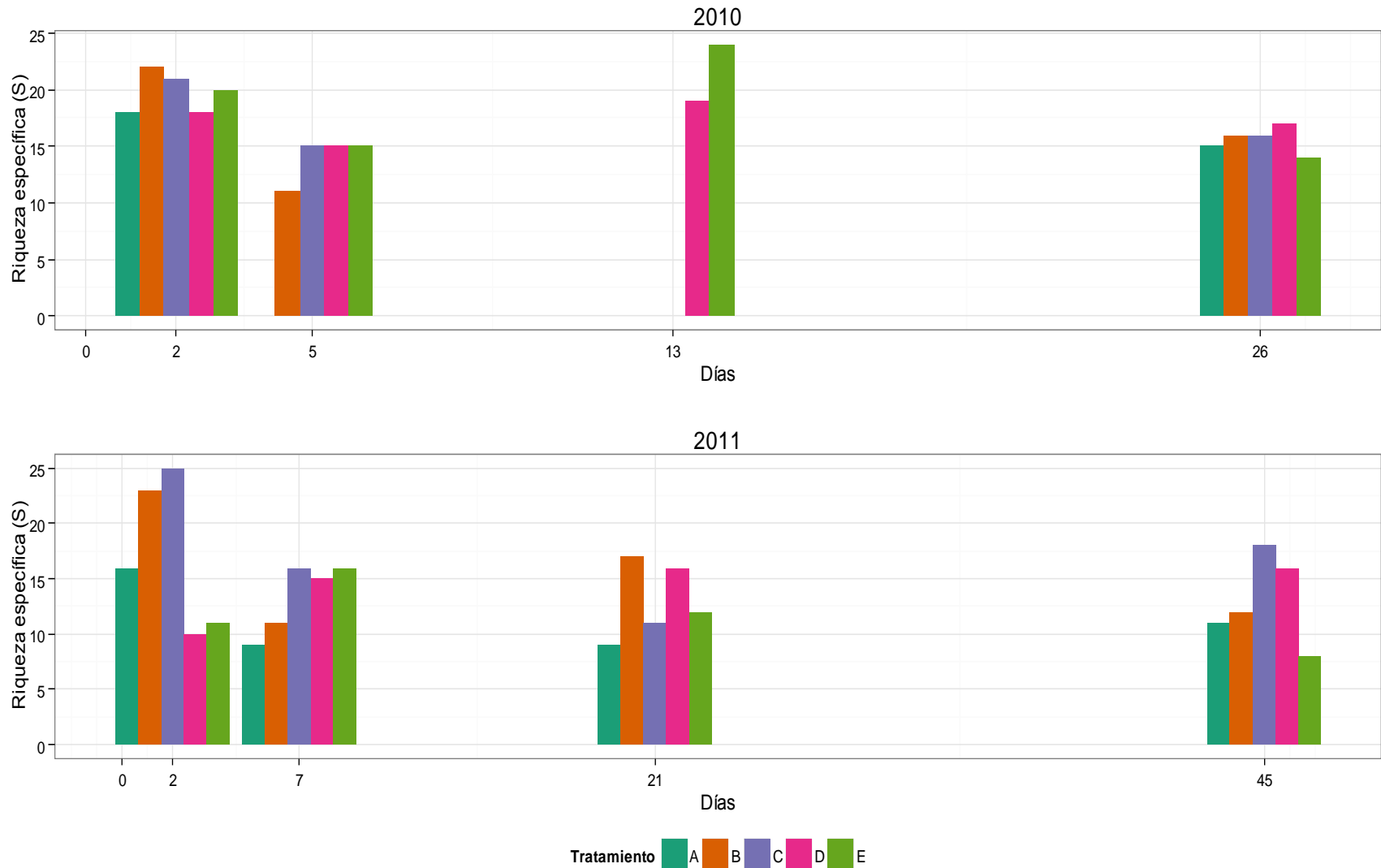


Figura 28: Riqueza específica (S) de las muestras de suelo obtenida a partir del análisis del patrón de bandas del EGGD. El día 0 corresponde a la aplicación de los herbicidas. Algunas muestras no se lograron amplificar, estas son para el día 5, muestra del tratamiento A y para día 13 las muestras de los tratamientos A, B y C. A: control; B: glifosato 1x; C: glifosato 2x; D: glifosato 1x + 2,4-D 1x; E glifosato 2x + 2,4-D.

Con la riqueza específica de cada muestra se construyó la Figura 28. En general en los suelos tratados se observó un aumento en la riqueza específica respecto al control. En 2010, la muestra que había recibido dosis doble de glifosato más 2,4-D mostró una disminución en su riqueza específica en la última fecha de muestreo. En 2011, se observó en el primer muestreo, mayor riqueza específica en el control que en los tratamientos combinados, esta situación se repitió para el último, al igual que en 2010, observándose una disminución en el número de polimorfismos para el tratamiento combinado de dosis doble de glifosato más 2,4-D.

A partir del coeficiente de similitud de Jaccard, se construyó el dendrograma mostrado en la Figura 29, con un coeficiente de correlación $r=0,86223$.

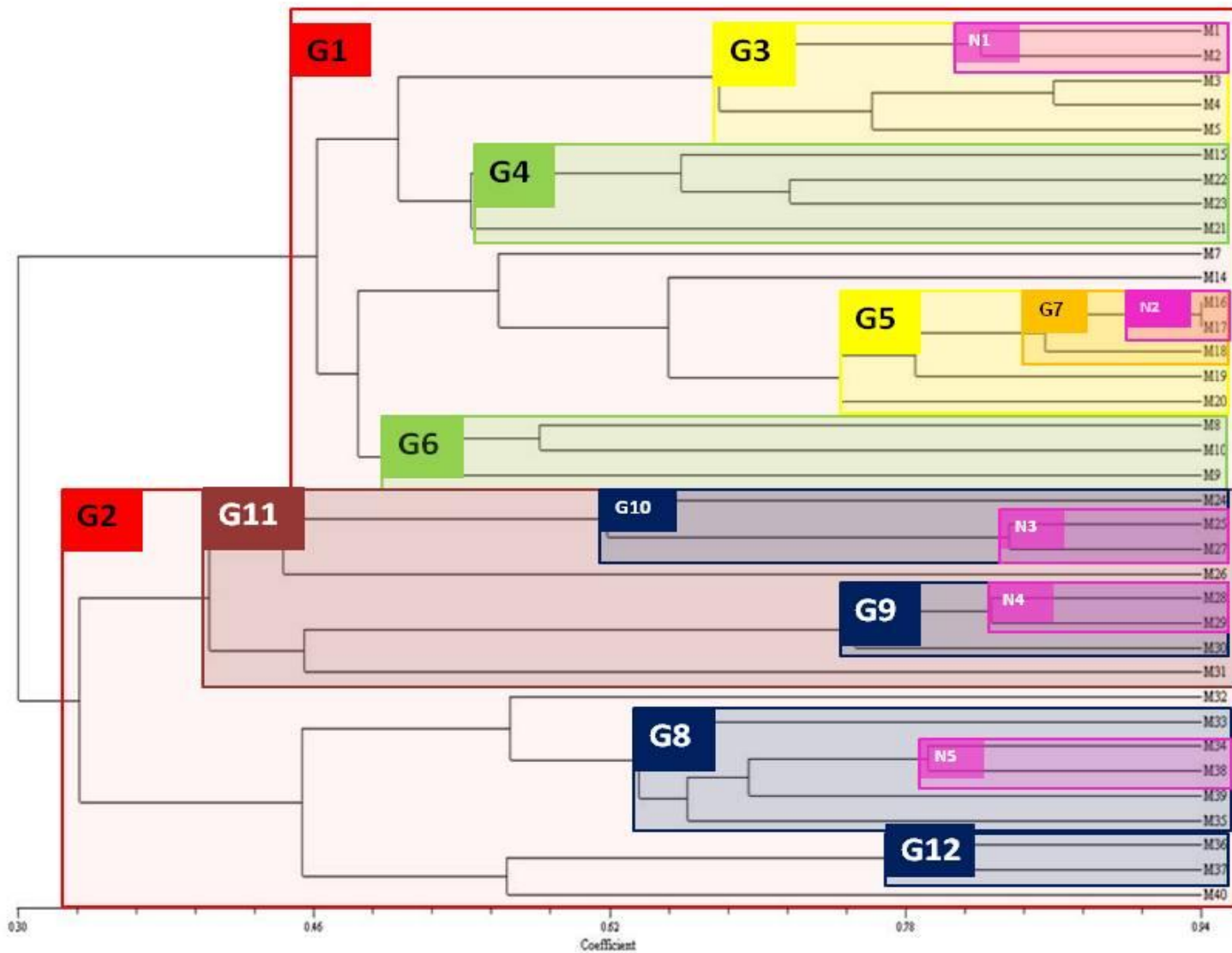


Figura 29: Dendrograma obtenido a partir del análisis de agrupamiento de bandas de los geles de EGGD (EF4/ITS4-ITS1FGC/ITS2), utilizando el método UPGMA a partir del coeficiente de asociación de Jaccard. Coeficiente de correlación del dendrograma $r=0,86223$.

Al analizar el dendrograma encontramos que hay dos grandes grupos formados a bajos niveles de similitud G1 y G2. El grupo G1 contiene a todas las muestras del año 2010 más 3 muestras del año 2011, con un nivel de similitud del 45 % y el grupo G2 está formado en su totalidad por muestras del año 2011, con un 33 % de similitud entre las muestras y Las muestras M22, M23 y M24 correspondiente al año 2011 presentan mayor grado de similitud con las muestras del año 2010. Al analizar el patrón de bandas de estas muestras (Figura 28), se observa que las mismas presentan bandas características de las muestras del período 2010. Estas bandas son A11, A14, A15, A16, A17, A18, A19, A20, A21, A27, A28 y A29.

A su vez dentro de los grupos G1 y G2, se forman grupos con niveles de similitud mayores. Con respecto al grupo G1, los subgrupos están formados, casi en su totalidad, por las muestras tomadas el mismo día. Basándonos en un nivel de similitud del 65 % o mayor, se forma el subgrupo G3, compuesto por las muestras M1-M5, todas tomadas el día 2 después de la primera aplicación de los herbicidas. Con un 68,4 % similitud se forma el G5, compuesto por las muestras M16-M20, todas tomadas el día 26. Dentro de G5, y con un nivel de similitud mayor al 74,8 % se forma el G7, conteniendo a M16, M17 y M18, procedentes de los tratamientos C, D y E, respectivamente. Las muestras M22 y M23 se agrupan con M15 con un nivel de similitud del 65 %, luego se agrega a este grupo la muestra M21, con una similitud menor. se forma el grupo G4. Con niveles de similitud cercanos al 50 %, se forma el grupo G6, que contiene muestras del día 5,

en este grupo no están todas las muestras del día 5 de ensayo, M7 no forma parte del mismo y la M6 no se logró amplificar el DNA.

Al analizar el grupo G2, los subgrupos se formaron a niveles de similitud más bajos. El grupo G8, es el más grande formado dentro del G2 y está formado por muestras procedentes de los tratamientos C, D ó E. Este grupo lo forma las muestras M34, M38, M39, M35 y M33 con un nivel de similitud mayor al 62 %, con un nivel de similitud del 54 % se une a este grupo M32, procedente del tratamiento B. Las muestras M28, M29 y M30 forman el grupo G9, con un nivel de similitud del 75 %. Todas estas muestras provienen de los tratamientos C, D ó E, y a su vez, estas muestras fueron tomadas todas el día 331 luego de iniciado el ensayo. Siguiendo este patrón de agrupamiento, con un 62 % de similitud, encontramos al grupo G10, formado por M24, M25 y M27, procedentes de los tratamientos, D, E y B, respectivamente. Dos de las muestras provenientes de los tratamientos control, M26 y M31 se unieron a los subgrupos a niveles de similitud menores al 45 %, formando el G11. Las muestras M36 y M37, tomadas el día 367 , procedentes de los tratamientos B y C, respectivamente, forman un el G12 con un nivel de similitud mayor al 70 %.

En el dendrograma encontramos núcleos de muestras con niveles de similitud mayores al 80 %. Dos de estos núcleos están formados por muestras control agrupadas con muestras tratadas con dosis simple de glifosato. Estos núcleos son: N1, formado por M1 y M2, y N2 formado por M16 y M17. Otros tres núcleos están formados por muestras de suelos tratados con distintas dosis o

combinaciones de glifosato y 2,4-D, estos son N3 formado por M25 y M27, N4 formado por M27, M28 y M29, y N5 formado por M34 y M38.

El nivel de polimorfismo detectado en el análisis de EGGD de las distintas muestras de suelo muestra que para períodos prolongados de exposición al glifosato en dosis dobles a la recomendada o en combinación con 2,4-D, las comunidades fúngicas del suelo van adquiriendo una estructura polimórfica característica muy distinta a la presente en los suelos control o a los tratados con la dosis de glifosato recomendada.

Discusión

Se utilizaron técnicas moleculares para estudiar el efecto de la aplicación de distintas dosis y combinaciones de herbicidas sobre las comunidades fúngicas de un suelo de una región agrícola de la provincia de Buenos Aires. Se extrajo exitosamente el ADN microbiano total de las muestras de suelo y la concentración de ADN extraído fue mayor que los valores obtenidos por Montecchia et al. (2011) para suelos agrícolas de la Argentina utilizando el kit de extracción Power Soil DNA Isolation kit (Mo Bio Lab. Inc).

La cantidad de ADN molde utilizada para las reacciones de PCR varió entre 25,4 y 38,37 ng de ADN y estos fueron valores similares a las utilizadas por diversos autores para realizar reacciones de PCR a partir de muestras ambientales (Borneman y Hartin, 2000; Oros-Sichler et al., 2006; Montecchia et al., 2011; Porras Alfaro et al., 2011).

La amplificación de ADN fúngico a partir de muestras ambientales es compleja. El primer paso el análisis molecular de las comunidades fúngicas presentes en muestras ambientales es la elección de los cebadores específicos para ampliar el ADN extraído previamente. Todos los cebadores utilizados en el presente trabajo: ITS1F, ITS1F-GC, ITS2, ITS3-GC, ITS4, EF4; tienen una elevada especificidad para amplificar ADN fúngico y son junto con otros cebadores, ampliamente utilizados para trabajar con muestras ambientales a nivel de especies (Grades y Bruns, 1993; Smit et al., 1999; Borneman y Hartin, 2000; van Elsas et al., 2000; Anderson et al., 2003a; Hagn et al., 2003; Klamer y Hedlund, 2004; Manter y Vivanco, 2007; Porras-Alfaro et al., 2007; Porras-Alfaro et

al., 2011; Toju et al., 2012). El juego de cebadores EF4/ITS4 seguido de amplificación con ITS1F-GC/ITS2 demostró ser más apropiado para revelar el nivel de polimorfismo presente en el ADN fúngico extraído a partir de las muestras de suelo utilizadas. Las amplificaciones obtenidas utilizando esta combinación de cebadores permitieron obtener un patrón de bandas definidas en los geles de EGGD, facilitando la interpretación de los datos.

La técnica de PCR-EGGD ha sido utilizada previamente en el estudio de las comunidades microbianas del suelo (Muyzer et al., 1993; Muyzer y Smalla, 1998; O'Callaghan et al., 2006; Nakatsu, 2007; Solaiman y Marschner, 2007; Montecchia et al., 2011; Vargas Gil et al., 2011; Cycón et al., 2013; Ng et al., 2014; Yang y Zhang, 2014). Existen numerosos estudios donde se aplica la técnica PCR-EGGD con buenos resultados (vas Elsas et al., 2000; Pennanen et al., 2001; Hagn et al., 2003; Anderson y Cairney, 2004; de Souza et al., 2004; Klamer y Hedlund, 2004; Oros-Sichler et al., 2006; Vargas Gil et al., 2011; Chen et al., 2013; Qin et al., 2014). Nuestros resultados indican que con el paso del tiempo y la exposición a los distintos tratamientos con herbicidas las comunidades fúngicas en los suelos agrícolas estudiados van cambiando. La estructura de las comunidades fúngicas de los suelos agrícolas es sensible y puede ser afectada tanto por alteraciones en las condiciones climáticas como por cambios de origen antrópico, como por ejemplo variaciones en el tipo de manejo del suelo (Vargas Gil et al., 2011) o la aplicación de agroquímicos (Ibekwe et al., 2001). Aplicando PCR-EGGD, se analizó la estructura de las comunidades fúngicas de suelos tratados con distintas dosis y combinaciones de los glifosato y 2,4-D. Se encontró una

variación en el número de polimorfismos para todos los suelos, con un mínimo de 8 (M40, tratamiento E, tomado el día 367) y un máximo de 25 (M23, tratamiento C, tomada el día 325), el total de bandas distintas registradas entre todos los perfiles fue de 40. El patrón de bandas de los perfiles de EGGD reflejó que las comunidades fúngicas estudiadas tienen una estructura compleja esperada en suelos agrícolas (Yang y Zhang, 2014). El análisis cualitativo de las comunidades de microorganismos de suelos se puede realizar rápidamente a partir de la observación y comparación de los perfiles de EGGD de distintas muestras de suelo (Nakatsu, 2007). En los perfiles se observaron bandas características de las comunidades que están presentes en todas las muestras. No obstante, unas pocas bandas aparecen ó desaparecen bajo un tratamiento específico, sugiriendo que en función del tratamiento se favorece el desarrollo de determinados grupos específicos.

El análisis del cladograma generado a partir de los perfiles de EGGD revela que la estructura de la comunidad fúngica se comportó de manera distinta durante las dos temporadas del ensayo. Para cada período se encontraron grupos de bandas característicos y esto explica el resultado del cladograma, que forma dos grandes grupos, uno para cada temporada de ensayo. El análisis de agrupamiento formó un gran grupo conteniendo a todas las muestras del año 2010, y dentro de este grupo, los subgrupos se formaron con los perfiles de las muestras procedentes de un mismo muestreo, indistintamente del tratamiento que hayan recibido. Este agrupamiento de las muestras en relación a cambios temporales, debidos posiblemente a variaciones en las condiciones ambientales, como las

precipitaciones o temperatura, ha sido encontrado en otras investigaciones (Buyer et al., 1999). Se debe tener en cuenta que el tipo de suelo, el clima y las prácticas de cultivo muchas veces tienen un mayor impacto en las comunidades de microorganismos del suelo que los residuos de los agroquímicos aplicados en los mismos (Buyer et al., 1999). Klamer y Hedlund (2004) hacen referencia a que variaciones en la composición de las comunidades fúngicas del suelo pueden ser atribuidas a cambios en el contenido de agua del suelo. Si bien durante el primer año las muestras de los suelos se agruparon en relación a un factor temporal, posiblemente las comunidades se estaban adaptando a la exposición a los distintos tratamientos con herbicidas; en el segundo año de aplicación las comunidades fúngicas del suelo mostraron algún grado de variación frente a los tratamientos aplicados.

Diversos estudios citan el efecto del glifosato sobre el funcionamiento de las comunidades fúngicas del suelo. Wardle y Parkinson (1990) encontraron que el glifosato aplicado a suelo con rastrojo de trigo estimula la colonización fúngica del material seco. Estudios subsiguientes revelaron que la aplicación de glifosato podría influenciar a la comunidad fúngica del suelo en general (Wardle y Parkinson, 1992). En suelos arenosos, con historia de repetidas aplicaciones de glifosato, las especies fúngicas capaces de utilizarlo como fuente de nutriente fueron seleccionadas, luego de la exposición prolongada al glifosato las comunidades fúngicas comienzan a estar dominadas por especies del género *Fusarium* spp. (Krzysko-Lupicka y Orlik, 1997; Means et al., 2007; Krzysko-Lupicka y Sudol, 2008).

Los perfiles moleculares encontrados en las muestras tratadas con dosis de glifosato simples, tienen mayor similitud entre si que con las muestras tratadas con dosis mayores de glifosato o en combinación con 2,4-D. Con los resultados encontrados, podemos decir que el glifosato cuando es aplicado en las dosis recomendadas no produce cambios sustanciales en la estructura de la comunidad fúngica del suelo. De acuerdo con nuestros hallazgos, Ratcliff et al. (2006), no encontraron cambios en la estructura de la comunidad microbiana de distintos suelos cuando el glifosato es aplicado en el suelo en las dosis recomendadas.

En cuanto al efecto del herbicida 2,4-D algunos estudios mencionan que las comunidades microbianas muestran un aumento en la riqueza funcional luego de la exposición a este herbicida (Zabaloy et al., 2008). Con los resultados obtenidos, podemos decir que la aplicación repetida de 2,4-D en combinación con glifosato, produce cambios en la estructura de las comunidades fúngicas del suelo. Luego de 2 años de tratamiento los suelos tratados con dosis de glifosato simples en combinación con 2,4-D (tratamiento D) mostraron perfiles moleculares diferentes a los revelados en muestras de suelos tratadas solamente con dosis de glifosato simples (tratamiento B) y bajos niveles de similitud. Se puede atribuir esa diferencia en los perfiles al efecto del 2,4-D, o al efecto de la aplicación conjunta de los dos herbicidas. Merini et al. (2007) encontraron que luego de la aplicación de 2,4-D se ve favorecida la presencia en el suelo de ciertos grupos de microorganismos degradadores, quizás esto podría explicar las bajas similitudes entre los perfiles de los tratamientos B y D luego de dos años de ensayo.

El grado de similitud de las muestras tratadas con glifosato solo o en combinación con 2,4-D, luego de dos años de tratamiento fue entre un 62 y 75 % y la similitud de estas muestras tratadas con el control fue menor al 45 %. Este resultado soporta la hipótesis de que la aplicación de herbicidas produce un cambio en la composición de las comunidades fúngicas del suelo. Los cambios estructurales detectados en las comunidades fúngicas del suelo no necesariamente implican una disminución en la diversidad, sino posiblemente una modificación en la composición de la misma.

La exposición a herbicidas de las comunidades de microorganismos en los suelos agrícolas tiene diferentes efectos en la microbiota del suelo (Chakravarty y Chatarpaul, 1990; Freemark y Boutin, 1995). Freemark y Boutin (1995) mencionan que luego de una prolongada exposición, los microorganismos se adaptan a las nuevas condiciones. Montecchia et al. (2011) detectaron variaciones en los perfiles moleculares de las comunidades microbianas en suelos agrícolas sometidos a distintos manejos. En cuanto al glifosato, este puede alterar la estructura de la comunidad microbiana del suelo, Kremer y Means (2009) mencionan que el glifosato tiene efectos secundarios “no-herbicidas” que pueden verse reflejados en un aumento o disminución de la actividad de algunas especies fúngicas en el suelo (Kremer y Means, 2009).

Se puede concluir que luego de una exposición prolongada a altas dosis de glifosato, solo o en combinación con 2,4-D, la composición de las comunidades fúngicas en el suelo estudiado cambió en respuesta al herbicida.

CONSIDERACIONES FINALES

En relación a las hipótesis planteadas al inicio de la tesis se puede concluir que el glifosato en dosis mayores a la recomendada solo o en combinación con 2,4-D afecta la dinámica de las comunidades fúngicas del suelo. Este efecto depende de varios factores simultáneamente como la concentración de los herbicidas, el tiempo transcurrido luego de la aplicación y las condiciones climáticas.

La biomasa fúngica resultó ser un parámetro sensible y mostró variaciones provocadas por la aplicación de herbicidas, siendo un parámetro muy útil como indicador biológico de la calidad del suelo. A su vez, se puede concluir que todas las metodologías empleadas resultan complementarias para obtener una idea global del estado del sistema.

El uso del herbicida glifosato en dosis altas o en combinación con 2,4 -D provoca alteraciones en la composición fúngica del suelo, y la exposición prolonga a los mismos genera cambios en las comunidades fúngicas, revelados por el análisis de los perfiles de EGGD.

En conclusión, luego de analizar la composición taxonómica de la comunidad y estimar la biomasa fúngica del suelo, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que en las dosis recomendadas la aplicación de glifosato no produjo cambios atribuibles al herbicida, no observándose diferencias respecto del tratamiento control. Sin embargo, en dosis mayores a las recomendadas (tanto solo como en combinación con 2,4-D) se observaron

cambios notorios, tanto en las estimaciones de biomasa como en los perfiles moleculares.

Cuando los ensayos se realizan en condiciones de campo, la heterogeneidad ambiental y las condiciones climáticas, son variables no controladas, que puede enmascarar los efectos producidos por los tratamientos aplicados. Para comprender las complejas respuestas que en las comunidades fúngicas del suelo inducen la aplicación de herbicidas es necesario un abordaje integral, ya que la información generada con las distintas metodologías, clásicas y modernas, es claramente complementaria y no excluyente.

ANEXO 1: Preparación, siembra, corrida y tinción de geles para EGGD

El sistema de EGGD (DGGE) empleado está formado por dos vidrios rectangulares, uno de ellos cañado en su parte superior. Los reactivos utilizados en el proceso de preparación y tinción del gel son muy tóxicos, se tomaron todas las medidas de seguridad necesarias para no exponerse a los mismos.

Preparación, siembra y corrida del gel

1. Se lavaron ambos vidrios con detergente neutro, para eliminar restos de suciedad o grasitud. Se realizó un enjuague final con agua bidestilada. Se dejó escurrir bien.
2. Se limpiaron ambos lados de los vidrios, dos veces, utilizando papel absorbente embebido en etanol 70 % en el primer lavado y etanol 96 % en el segundo.
3. Una vez que los vidrios se secaron, se los colocó en el soporte para el armado del gel y se los ajustó a las gomas que los sostienen para evitar filtraciones de gel durante el armado.
4. Se prepararon las soluciones stock. El gradiente de desnaturalización utilizado fue del 10-50 % urea-formamida. Para preparar las soluciones con estas concentraciones se parte de soluciones stock (que fueron preparadas y conservadas con antelación).

- Solución stock de acrilamida al 30 %

- Solución stock 0 y 80 % agente desnaturalizante,

- Solución TAE 20X

- Solución TAE 1X

- Stock de persulfato de amonio APS 10 %

- TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

- Solución buffer de carga, azul de bromo fenol-sacarosa.

5. Se preparó el sistema para llenar el gel. Se colocó el mezclador de gradientes sobre un agitador magnético, se le agregaron los magnetos-agitadores en las cámaras del mezclador y se conectó la manguera de la bomba peristáltica en la cámara de salida del mezclador y por el extremo se le colocó un tip de punta fina. Se comprobó el correcto funcionamiento del sistema y de la bomba haciendo circular agua bi-destilada estéril por todo el sistema. Luego se conectó la manguera en el espacio entre los dos vidrio para poder llenarlo con el gel.

6. Se prepararon las soluciones desnaturalizantes al 10 y 50 % de agente desnaturalizante, a partir de las soluciones stock ya preparadas. Las soluciones se prepararon en tubos de polipropileno descartables. El agregado de los componentes de las soluciones se hizo en el siguiente orden: solución al 50% de agente desnaturalizante, solución al 10% y solución stock 0 % agente desnaturalizante para el peine, buffer de carga (en el caso que correspondió), TEMED. Se mezcló perfectamente sin generar burbujas. Se prepararon las tres soluciones necesarias en tubos de plástico, y en el momento de cargar el gel, cuando las colocamos en el mezclador de gradientes se agregó el APS. El

agregado del APS inició el proceso de polimerización, por lo cual se agregó a la solución justo antes de empezar a armar el gel. La polimerización una vez agregado el TEMED y el APS es más rápida e irreversible.

	Solución 50 % agente desnaturalizante	Solución 10 % agente desnaturalizante	Solución 0 % agente desnaturalizante
Stock 80 %	9.37 ml	1.87 ml	-
Stock 0 %	5.63 ml	13.12 ml	10 ml
TEMED	15 µl	15 µl	10 µl
APS	93 µl	93 µl	62 µl
Azul bromo fenol- sacarosa	75 µl	-	-
Volumen final	15 ml	15 ml	10 ml

7. Se volcó en la primera cámara de salida del mezclador de gradientes la solución 50 % agente desnaturalizante y se encendió el agitador magnético. Luego se volcó la solución al 10 % en la otra cámara del mezclador, ambas cámara con las llaves de paso cerradas.

8. Se abrió la llave de paso de la cámara de salida del mezclador y simultáneamente se encendió la bomba peristáltica a una velocidad de 4 ml/min, la solución de mayor concentración de agente desnaturalizante progresivamente comenzó a llenar el espacio entre los vidrios y automáticamente se abre la llave del segundo mezclador.

9. Una vez volcadas las soluciones con agente desnaturalizante, se retiró la manguera entre los vidrios, se enjuagó todo el sistema haciendo correr agua destilada, para no dejar restos de acrilamida/bisacrilamida que obstruyan el sistema de llenado de geles.

10. Se volvió a colocar la manguera entre los vidrios, y se volcó la solución al 0 % de agente desnaturizante en la cámara de salida del mezclador, se abrió la llave de paso y luego se encendió la bomba. Se terminó de cargar el espacio entre los vidrios con la solución al 0 % y se colocó el peine para marcar las calles de siembra. La solución sin agente desnaturizante, nos aseguró la correcta entrada de las muestras de ADN dentro del gel.

11. Una vez volcado todo el gel, se retiró la manguera de llenado y rápidamente se colocó el peine, se dejó polimerizar el gel durante aproximadamente 2 horas a 20 °C.

12. Una vez polimerizado, se retiró del soporte y se llevó a la cuba de electroforesis de EGGD. Se desmontó el gel de los soportes y se colocó dentro de la cuba. Se llenó la cuba de electroforesis con buffer TAE 1X, aproximadamente 3,5-4 litros.

14. Se retiraron los peines de los vidrios con cuidado de no romper las calles y se conectó el sistema para precalentar el buffer a 60 °C.

5. Se tomaron las muestras a sembrar y se colocaron en el termociclador 2 minutos a 95 °C para desnaturizar el ADN y lograr una máxima separación de bandas.

16. Se sembraron las muestras mezcladas con 5 µl de Azul de bromofenol-sacarosa, como buffer de carga. Para la siembra de las muestras se utilizó una micro jeringa Hamilton de 25 µl. La jeringa se lavó con agua destilada después de

sembrar cada muestra para evitar la contaminación. Se sembraron además de las muestras, un control positivo y uno negativo.

17. Se completa con buffer TAE 1X el espacio entre ambos vidrios y encima de las calles y se conecta la cuba a la fuente de poder y se corre durante 6 horas a 70 V, y a una temperatura de 60 °C.

Soluciones para el armado del gel

- **Solución stock de acrilamida al 30 %** (acrilamida:bis-acrilamida 37,5:1). Se disolvieron las drogas secas en agua hasta el volumen final, y se almacenaron en oscuridad a 4 °C.

Acrilamida	29,22 g
Bis-acrilamida	0,78 g
H ₂ O _{dest}	Volumen final 100 ml

- **Solución TAE 20X**. Se disolvieron las drogas secas en agua hasta el volumen final, se ajustó a pH=8 con ácido acético glacial.

Tris base 0.8M	96,912 g
Acetato sódico 0.4M	54,432 g
H ₂ O _{dest}	Volumen final 1000 ml
Ácido acético glacial	Aproximadamente 36 ml

- **Solución stock al 0 %** de agente desnaturizante. Se filtró a través de filtro de 0,2 µm (Nucleopore GF/F filter) y se almacenó en recipiente de vidrio, en oscuridad a 4 °C.

Solución stock acrilamida al 30 %	20 ml
TAE 20X	2 ml
H ₂ O _{dest}	78 ml

- **Solución stock al 80 %** de agente desnaturalizante. Se filtró a través de filtro de 0,2 µm (Nucleopore GF/F filter) y se almacenó en recipiente de vidrio, en oscuridad a 4 °C.

Solución stock acrilamida al 30 %	20 ml
TAE 20X	2 ml
Urea (de grado electroforesis)	33,6 g
Formamida deionizada	32 ml
H ₂ O _{dest}	Volumen final 100 ml

- **Solución stock de APS al 10 %**. Se puede guardar pesado en eppendorf y agregarle el agua destilada en el momento de utilizarlo. Se almacena a temperatura ambiente. Se utilizó como catalizador de la reacción de polimerización. Se mezcló con el agua destilada en el momento de utilizarlo.

Persulfato de Amonio	0,1 g
H ₂ O _{dest}	1 ml

- **TEMED**, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina. Se conservó en heladera, se utiliza como iniciador del proceso de polimerización.

- **Azul de bromo fenol-sacarosa (loading buffer)**. Se mezclaron las cantidades indicadas de cada droga, se almacenó a -20°C y descongeló al momento de utilizarlo.

Ficoll	2,5 gr
EDTA 1mM)	10 ml
Azul de bromofenol	0,25 g
H ₂ O _{dest}	100 ml

- **Solución TAE 1X**, buffer de corrida, se almacenó a temperatura ambiente, se utilizaron aproximadamente 4000 ml para llenar la cuba de EGGD.

TAE 20X	50 ml
H ₂ O _{bidestilada}	950 ml

Tinción del gel con solución de plata

1. Una vez finalizada la corrida, se desconectaron los cables y se tomó el soporte que contiene los vidrios, se sacó de la cuba y se vació el contenido de buffer que queda entre ambos vidrios.
2. Se separaron ambos vidrios, sobre una superficie plana, con la ayuda de una espátula (cuidando de no rayar los vidrios). Al despegarse ambos vidrios, el gel quedó adherido a la superficie de uno de ellos.
3. Se colocó en un recipiente plástico la solución de ácido acético al 10 %, y se colocó el vidrio con el gel adherido (el gel hacia abajo) y dando movimientos

suaves se despegó el gel del vidrio. Se dejó el gel durante 20 minutos en esta solución, en agitador orbital.

4. Se recuperó el ácido acético, para utilizarlo posteriormente. Se lavó al gel en H_2O_{dest} durante 2 minutos tres veces, en el agitador orbital.

5. Se escurrió el gel y se lo sumergió en la solución de plata. Se colocó en oscuridad y en agitador orbital durante 30 minutos.

6. Se escurrió el gel y se lo sumergió 10 segundos en H_2O_{dest} en agitador orbital.

7. Se escurrió el gel y se lo colocó en la solución de carbonato de sodio, en agitador orbital. Esta solución comenzó a precipitar la plata usada en la tinción y se empezaron a ver las bandas. En este paso se debió controlar que no se oscurezca demasiado el gel, el tiempo aproximado de este paso son 3 a 5 minutos. Hasta lograr la tinción deseada. Se debió tener especial precaución en este momento de la tinción ya que mucho tiempo en esta solución puede teñir mucho el gel impidiendo la correcta visualización de las bandas del gel de EGGD.

8. Se escurrió el gel y se colocó en ácido acético al 10 % (usado anteriormente) y se dejó 20 minutos, en el agitador orbital.

9. Se lavó el gel en H_2O_{dest} durante 5 minutos.

10. Se colocó el soporte para enmarcar el gel y se lo cubrió con agua. Se colocó el soporte plástico y se estiró sobre él un cuadrado de papel celofán. Se acomodó y estiró bien el gel sobre el papel celofán y se lo cubrió con otra hoja de papel

celofán. Se colocó el soporte para ajustar y se ajustó bien con broches plásticos.

Se retiró el gel montado con el celofán del soporte y se lo dejó secar 3 a 4 días.

Soluciones para la tinción del gel

- **Solución ácido acético 10 %**. Se preparó en el momento de usarlo, cuando se recupera se conservó en contenedor plástico.

Ácido acético glacial	100 ml
H ₂ O _{dest}	1000 ml

-**Solución de plata**. Se reutilizó hasta 4-5 veces, se mantuvo protegida de la luz.

Nitrato de plata	1 g
Formaldehído	1,280 ml
H ₂ O _{dest}	1000 ml

- **Tiosulfato de sodio 10 %**, se conserva en stock, en heladera.

Tiosulfato de Na	1 g
H ₂ O _{dest}	10 ml

- **Solución de carbonato de sodio**, se preparó en el momento de uso.

Carbonato de Na	15 g
Tiosulfato de sodio 10 %	92,85 µl
Formaldehído	640 µl
H ₂ O _{dest}	500 ml

BIBLIOGRAFÍA

- Adawiah Binti, I. (2008). Isolation, characterization and identification of microorganisms from soil contaminated with pesticide. Thesis.
- Alef, K. & Nannipieri, P. (1995). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic press, New York.
- Aleixo, A.P., Kaschuk, G. & Alberton, O. (2014). Soil fungal and bacterial biomass determined by epifluorescence microscopy and mycorrhizal spore density in different sugarcane managements. *Ciência Rural*, 44(4): 588-594.
- Alexander, M. (1978). Introduction to soil microbiology. *Soil Science*, 125(5): 331.
- Altieri, M.A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74(1): 19-31.
- Allegrucci, N., Cabello, M.N. & Arambarri, A.M. (2009). Diversity of saprotrophic anamorphic Ascomycetes. *Darwiniana*, 47(1): 108-124.
- Allegrucci, N., Elíades, L., Bucsinszky, A., Cabello, M. & Arambarri, A. (2007). Diversity of anamorphic fungi from Ascomycota in *Celtis tala* (Ulmaceae) native forests in the Buenos Aires province, Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 42: 79-86.
- Amann, R.I., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1): 143-169.
- Anderson, I.C. & Cairney, J.W. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, 6(8): 769-779.
- Anderson, I.C., Campbell, C.D. & Prosser, J.I. (2003a). Diversity of fungi in organic soils under a moorland Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. *Environmental Microbiology*, 5(11): 1121-1132.
- Anderson, I.C., Campbell, C.D. & Prosser, J.I. (2003b). Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environmental Microbiology*, 5(1): 36-47.

- Aon, M., Cabello, M., Sarena, D., Colaneri, A., Franco, M., Burgos, J. & Cortassa, S. (2001). I. Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 18(3): 239-254.
- Aon, M. & Colaneri, A. (2001). II. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. *Applied soil ecology*, 18(3): 255-270.
- Araújo, A.S.F., Monteiro, R.T.R. & Abarkeli, R.B. (2003). Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, 52(5): 799-804. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00266-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00266-2).
- Arshad, M.A. & Martin, S. (2002). Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 88(2): 153-160.
- Avaniss-Aghajani, E., Jones, K., Chapman, D. & Brunk, C. (1994). A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. *BioTechniques*, 17(1): 144-146, 148-149.
- Bååth, E. & Söderström, B. (1982). Seasonal and spatial variation in fungal biomass in a forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 14(4): 353-358.
- Bailey, V.L., Smith, J.L. & Bolton Jr, H. (2002). Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated for enhanced C sequestration. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(7): 997-1007.
- Bakken, L.R. & Olsen, R.A. (1983). Buoyant densities and dry-matter contents of microorganisms: conversion of a measured biovolume into biomass. *Applied and environmental microbiology*, 45(4): 1188-1195.
- Baláz, M. & Vosátka, M. (2001). A novel inserted membrane technique for studies of mycorrhizal extraradical mycelium. *Mycorrhiza*, 11(6): 291-296.
- Barbaruah, B., Chutia, M. & Boruah, P. (2012). Soil hyphomycetes population dynamics in disturbed and undisturbed tropical soils of North-eastern India. *African Journal of Microbiology Research*, 6(25): 5344-5352.
- Bardgett, R.D., Lovell, R.D., Hobbs, P.J. & Jarvis, S.C. (1999). Seasonal changes in soil microbial communities along a fertility gradient of temperate

- grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(7): 1021-1030. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00016-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00016-4).
- Bateman, G. & Murray, G. (2001). Seasonal variations in populations of *Fusarium* species in wheat-field soil. *Applied soil ecology*, 18(2): 117-128.
- Beare, M., Hu, S., Coleman, D. & Hendrix, P. (1997). Influences of mycelial fungi on soil aggregation and organic matter storage in conventional and no-tillage soils. *Applied soil ecology*, 5(3): 211-219.
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3): 426-438.
- Bloem, J. (1995). Fluorescent staining of microbes for total direct counts. (Eds.). *Molecular microbial ecology manual* (pp. 367-378). Springer.
- Bloem, J., Vos, A., Kowalchuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L. & van Elsas, J.D. (2004). Fluorescent staining of microbes for total direct counts. *Molecular microbial ecology manual*, 1, 2(Ed. 2): 861-873.
- Bode, R., Schauer, F. & Birnbaum, D. (1986). Comparative Studies on the Enzymological Basis for Growth Inhibition by Glyphosate in some Yeast Species. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 181(1): 39-46. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-3796\(86\)80018-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-3796(86)80018-X).
- Bölter, M., Bloem, J., Meiners, K. & Möller, R. (2002). Enumeration and biovolume determination of microbial cells—a methodological review and recommendations for applications in ecological research. *Biology and Fertility of Soils*, 36(4): 249-259.
- Borneman, J. & Hartin, R.J. (2000). PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and environmental microbiology*, 66(10): 4356-4360.
- Bórtoli, P., Verdenelli, R., Conforto, C., Vargas Gil, S. & Meriles, J. (2012). Efectos del herbicida glifosato sobre la estructura y el funcionamiento de comunidades microbianas de dos suelos de plantaciones de olivo. *Ecología austral*, 22: 33-42.
- Boschin, G., D'Agostina, A., Arnoldi, A., Marotta, E., Zanardini, E., Negri, M. & Sorlini, C. (2003). Biodegradation of Chlorsulfuron and Metsulfuron Methyl

- by *Aspergillus niger* in Laboratory Conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 38(6): 737-746.
- Bougoure, D.S. & Cairney, J.W. (2005). Fungi associated with hair roots of *Rhododendron lochiae* (Ericaceae) in an Australian tropical cloud forest revealed by culturing and culture-independent molecular methods. *Environmental Microbiology*, 7(11): 1743-1754.
- Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J. & Desjardins, R. (1999). Live/Dead™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1): 77-86.
- Bridge, P. & Spooner, B. (2001). Soil fungi: diversity and detection. *Plant and soil*, 232(1-2): 147-154.
- Buscot, F. & Varma, A. (2005). *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer, Berlin.
- Busse, M.D., Ratcliff, A.W., Shestak, C.J. & Powers, R.F. (2000). Non-target effects of glyphosate on soil microbes. Proceedings of the California Weed Science Society.
- Busse, M.D., Ratcliff, A.W., Shestak, C.J. & Powers, R.F. (2001). Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12): 1777-1789.
- Busse, M.D., Sanchez, F.G., Ratcliff, A.W., Butnor, J.R., Carter, E.A. & Powers, R.F. (2009). Soil carbon sequestration and changes in fungal and bacterial biomass following incorporation of forest residues. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(2): 220-227.
- Buyer, J.S., Roberts, D.P. & Russek-Cohen, E. (1999). Microbial community structure and function in the spermosphere as affected by soil and seed type. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(2): 138-144.
- Cabello, M. (1985). Estudio ecológico de la micoflora del suelo de la región interserrana. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata, Universidad de La Plata, La Plata.

- Cabello, M. (1986). Análisis de la metodología empleada en el aislamiento de hongos en suelos de la región interserrana (Partido de Coronel Suárez). *Ciencia del suelo*, 2: 225-229.
- Cabello, M. & Arambarri, A. (2002). Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). *Microbiological research*, 157(2): 115-125.
- Carlisle, S. & Trevors, J. (1988). Glyphosate in the environment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 39(3-4): 409-420.
- Carter, M.R., Gregorich, E., Anderson, D., Doran, J., Janzen, H. & Pierce, F. (1997). Concepts of soil quality and their significance. *Developments in Soil Science*, 25: 1-19.
- Castro Jr, J.V., Peralba, M.C. & Ayub, M.A. (2007). Biodegradation of the herbicide glyphosate by filamentous fungi in platform shaker and batch bioreactor. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 42(8): 883-886.
- Cerdeira, A.L. & Duke, S.O. (2006). The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops. *Journal of environmental quality*, 35(5): 1633-1658.
- Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos CONICET, (2009). *Informe de evaluación de la información científica existente vinculada a la incidencia del glifosato sobre la salud humana y el ambiente*. CONICET, Buenos Aires.
- Cooper, J. & Dobson, H. (2007). The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection*, 26(9): 1337-1348.
- Cui, H., Wang, C., Gu, Z., Zhu, H., Fu, S. & Yao, Q. (2014). Evaluation of soil storage methods for soil microbial community using genetic and metabolic fingerprintings. *European Journal of Soil Biology*, 63(0): 55-63. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.05.006>.
- Cycoń, M., Markowicz, A. & Piotrowska-Seget, Z. (2013). Structural and functional diversity of bacterial community in soil treated with the herbicide napropamide estimated by the DGGE, CLPP and r/K-strategy approaches.

- Applied soil ecology*, 72(0): 242-250. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.07.015>.
- Chakravarty, P. & Chatarpaul, L. (1990). Non-target effect of herbicides: I. effect of glyphosate and hexazinone on soil microbial activity. Microbial population, and in-vitro growth of ectomycorrhizal fungi. *Pesticide Science*, 28(3): 233-241. DOI: 10.1002/ps.2780280302.
- Chen, B., Huang, X., Zheng, J.-W., Li, S.-P. & He, J. (2009). *Candida mengyuniae* sp. nov., a metsulfuron-methyl-resistant yeast. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(5): 1237-1241.
- Chen, J., Liu, X., Zheng, J., Zhang, B., Lu, H., Chi, Z. & Yu, X. (2013). Biochar soil amendment increased bacterial but decreased fungal gene abundance with shifts in community structure in a slightly acid rice paddy from Southwest China. *Applied soil ecology*, 71(0): 33-44. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.05.003>.
- de Souza, F.A., Kowalchuk, G.A., Leeflang, P., van Veen, J.A. & Smit, E. (2004). PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter-and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. *Applied and environmental microbiology*, 70(3): 1413-1424.
- de Vries, F.T., Bloem, J., van Eekeren, N., Brussaard, L. & Hoffland, E. (2007). Fungal biomass in pastures increases with age and reduced N input. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(7): 1620-1630.
- De Vries, F.T., Hoffland, E., van Eekeren, N., Brussaard, L. & Bloem, J. (2006). Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting nitrogen management. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(8): 2092-2103.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. (2012). Infostat 2012 Software versión Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson, T.H. (1993). *Compendium of soil fungi*. IHW-Verlag, Eching, Germany.

- Donnelly, P., Entry, J. & Crawford, D. (1993). Degradation of atrazine and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid by mycorrhizal fungi at three nitrogen concentrations in vitro. *Applied and environmental microbiology*, 59(8): 2642-2647.
- Doran, J.W. & Parkin, T.B. (1994). Defining and assessing soil quality. *SSSA special publication*, 35: 3-3.
- Eliades, L.A. (2009). Estudio de la micobiota alcalofílica y alcalino-tolerante del suelo de los bosques de *Celtis tala* Gill (ex Planch) y *Scutia buxifolia* Reiss en el Partido de Magdalena, provincia de Buenos Aires. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo,
- Ferrari, M. (2010). ¿Nuestros actuales sistemas de producción agrícola son ambientalmente sustentables? *Informaciones Agronómicas del Cono Sur*, 48: 6-10.
- Fisher, M.M. & Triplett, E.W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and environmental microbiology*, 65(10): 4630-4636.
- Fließbach, A. & Mäder, P. (2000). Microbial biomass and size-density fractions differ between soils of organic and conventional agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(6): 757-768.
- Franz, J.E., Mao, M.K. & Sikorski, J.A. (1997). *Glyphosate: a unique global herbicide*. American Chemical Society, Estados Unidos.
- Freemark, K. & Boutin, C. (1995). Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: a review with special reference to North America. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 52(2): 67-91.
- Frey, S.D., Elliott, E.T. & Paustian, K. (1999). Bacterial and fungal abundance and biomass in conventional and no-tillage agroecosystems along two climatic gradients. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(4): 573-585. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00161-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00161-8).

- Gaddeyya, G., Shiny Niharika, P., Bharathi, P. & Ratna Kumar, K. (2012). Isolation and identification of soil mycoflora in different crop fields at Salur Mandal. *Advances in Applied Science Research*, 3(4): 2020-2026.
- Gams, W. (2007). Biodiversity of soil-inhabiting fungi. *Biodiversity and Conservation*, 16(1): 69-72.
- García-Orenes, F., Guerrero, C., Roldán, A., Mataix-Solera, J., Cerdà, A., Campoy, M. & Caravaca, F. (2010). Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. *Soil and Tillage Research*, 109(2): 110-115.
- Gardes, M. & Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2): 113-118.
- Gaspar, M.L., Cabello, M.N., Pollero, R. & Aon, M.A. (2001). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of fungal biomass in soil. *Current microbiology*, 42(5): 339-344.
- Ghosh, P.K. & Philip, L. (2004). Atrazine degradation in anaerobic environment by a mixed microbial consortium. *Water research*, 38(9): 2277-2284.
- Gomez, E., Ferreras, L., Lovotti, L. & 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(2): 163-167.
- Grossbard, E. & Atkinson, D., Eds. (1985). The herbicide glyphosate. Butterworths, London, UK.
- Haas, D., Galler, H., Luxner, J., Zarfel, G., Buzina, W., Friedl, H. & Reinthaler, F.F. (2013). The concentrations of culturable microorganisms in relation to particulate matter in urban air. *Atmospheric Environment*, 65(0): 215-222. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.10.031>.
- Hagn, A., Pritsch, K., Schloter, M. & Munch, J.C. (2003). Fungal diversity in agricultural soil under different farming management systems, with special reference to biocontrol strains of *Trichoderma* spp. *Biology and Fertility of Soils*, 38(4): 236-244.

- Haney, R., Senseman, S. & Hons, F. (2002). Effect of Roundup Ultra on microbial activity and biomass from selected soils. *Journal of environmental quality*, 31(3): 730-735.
- Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1· 5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12): 1422-1432.
- He, Y.H., Shen, D.S., Hu, L.F. & Zhu, Y.M. (2007). Study on metsulfuron-methyl degradation in simulated wheat (*Triticum Aestivum* L.) rhizospheric soil with *Penicillium* sp. inoculation. *Water, air, and soil pollution*, 179(1-4): 297-307.
- Head, I., Saunders, J. & Pickup, R. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35(1): 1-21.
- Heinfling, A., Bergbauer, M. & Szewzyk, U. (1997). Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(2): 261-266.
- Heredia Abarca, G., Reyes Estebanez, M. & Arias Mota, R.M. (2004). Adiciones al conocimiento de la diversidad de los hongos conidiales del Bosque Mesófilo de Montaña del Estado de Veracruz. *Acta Botánica Mexicana*, 66: 1-22.
- Hieber, M. & Gessner, M.O. (2002). Contribution of stream detritivores, fungi, and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates. *Ecology*, 83(4): 1026-1038.
- Hill, G., Mitkowski, N., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L., Jurkonie, D., Ficke, A. & Nelson, E. (2000). Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied soil ecology*, 15(1): 25-36.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J. & Jasper, S. (1977). Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and environmental microbiology*, 33(5): 1225-1228.
- Hýsek, J., Fišar, Z., Žižka, Z., Kofroňova, O. & Binek, B. (1991). Airborne microorganism monitoring: A comparison of several methods, including a new direct counting technique. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 146(6): 435-443. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0232-4393\(11\)80270-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0232-4393(11)80270-2).

- Ibekwe, A.M., Papiernik, S.K., Gan, J., Yates, S.R., Yang, C.-H. & Crowley, D.E. (2001). Impact of fumigants on soil microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 67(7): 3245-3257.
- Irrazabal, G.B., Schalamuk, S. & Velázquez, M.S. (2005). Especies de hongos formadores de micorrizas arbusculares, nuevas citas para la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 40: 1-2.
- Ismail, B., Goh, K. & Kader, J. (1996). Effects of metsulfuron methyl on microbial biomass and populations in soils. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 31(5): 987-999.
- Jeewon, R. & Hyde, K. (2007). Detection and diversity of fungi from environmental samples: traditional versus molecular approaches. (Eds.). *Advanced Techniques in Soil Microbiology* (pp. 1-15). Springer.
- Jenkinson, D. (1990). An introduction to the global nitrogen cycle. *Soil use and management*, 6(2): 56-61.
- Johal, G. & Huber, D. (2009). Glyphosate effects on diseases of plants. *European Journal of Agronomy*, 31(3): 144-152.
- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H. & Trevors, J.T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58(2): 169-188.
- Klamer, M. & Hedlund, K. (2004). Fungal diversity in set-aside agricultural soil investigated using terminal-restriction fragment length polymorphism. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(6): 983-988.
- Klein, D.A. & Paschke, M.W. (2000). A soil microbial community structural-functional index: the microscopy-based total/active/active fungal/bacterial (TA/AFB) biovolumes ratio. *Applied Soil Ecology*, 14(3): 257-268.
- Klimek, M., Lejczak, B., Kafarski, P. & Forlani, G. (2001). Metabolism of the phosphonate herbicide glyphosate by a non-nitrate utilizing strain of *Penicillium chrysogenum*. *Pest management science*, 57(9): 815-821.
- Klingen, I., Eilenberg, J. & Meadow, R. (2002). Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 91(1): 191-198.

- Kogure, K., Simidu, U. & Taga, N. (1979). A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 25(3): 415-420.
- Kremer, R.J. & Means, N.E. (2009). Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. *European Journal of Agronomy*, 31(3): 153-161. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2009.06.004>.
- Krzyśko-Łupicka, T. & 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(12): 2601-2605.
- Krzyśko-Lupicka, T., Strof, W., Kubś, K., Skorupa, M., Wieczorek, P., Lejczak, B. & Kafarski, P. (1997). The ability of soil-borne fungi to degrade organophosphonate carbon-to-phosphorus bonds. *Applied microbiology and biotechnology*, 48(4): 549-552.
- Krzysko-Lupicka, T. & Sudol, T. (2008). Interactions between glyphosate and autochthonous soil fungi surviving in aqueous solution of glyphosate. *Chemosphere*, 71(7): 1386-1391.
- Kurek, E., Kornilowicz-Kowalska, T., Słomka, A. & Melke, J. (2007). Characteristics of soil filamentous fungi communities isolated from various micro-relief forms in the high Arctic tundra (Bellsund region, Spitsbergen). *Polish Polar Research*, 28(1): 57-73.
- Li, A., Liu, Z., Liu, Y., Xu, X. & Pu, Y. (2012). Experimental study on microorganism ecological distribution and contamination mechanism in supply air ducts. *Energy and Buildings*, 47(0): 497-505. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enbuild.2011.12.025>.
- Li, Y., Dick, W.A. & Tuovinen, O.H. (2004). Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganisms—a review. *Biology and Fertility of Soils*, 39(5): 301-311.
- Lim, Y.W., Kim, B.K., Kim, C., Jung, H.S., Kim, B.-S., Lee, J.-H. & Chun, J. (2010). Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. *The Journal of Microbiology*, 48(3): 284-289.

- Lindström, E. & Leskinen, E. (2002). Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. *Microbial Ecology*, 44(1): 1-9.
- Lipok, J., Dombrowska, I., Wieczorek, P., Kafarski, P., Del Re, A., Capri, E. & Trevisan, M. (2003). The ability of fungi isolated from stored carrot seeds to degrade organophosphonate herbicides. Pesticide in air, plant, soil & water system. , La Goliardica Pavese srl.
- Liu, B.-R., Jia, G.-M., Chen, J. & Wang, G. (2006). A Review of Methods for Studying Microbial Diversity in Soils. *Pedosphere*, 16(1): 18-24. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(06\)60021-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(06)60021-0).
- Liu, W.-T., Marsh, T.L., Cheng, H. & Forney, L.J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 63(11): 4516-4522.
- Liu, W.K. (2008). Effects of Soil Disturbance and Organic P on Mycorrhiza Development and Symbiotic Efficiency of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Biological Agriculture & Horticulture*, 26(3): 269-277.
- Lorch, H., Benckieser, G. & Ottow, J. (1995). Basic methods for counting microorganisms in soil and water. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*: 146-161.
- Lori, G., Sisterna, M., Sarandon, S., Rizzo, I. & Chidichimo, H. (2009). Fusarium head blight in wheat: impact of tillage and other agronomic practices under natural infection. *Crop protection*, 28(6): 495-502.
- Lu, P., Jin, L., Liang, B., Zhang, J., Li, S., Feng, Z. & Huang, X. (2011). Study of biochemical pathway and enzyme involved in metsulfuron-methyl degradation by *Ancylobacter* sp. XJ-412-1 isolated from soil. *Current microbiology*, 62(6): 1718-1725.
- Lugo, M.A. & Cabello, M.N. (2002). Native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from mountain grassland (Córdoba, Argentina) I. Seasonal variation of fungal spore diversity. *Mycologia*, 94(4): 579-586.

- Lupwayi, N., Harker, K., Clayton, G., O'Donovan, J. & Blackshaw, R. (2009). Soil microbial response to herbicides applied to glyphosate-resistant canola. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 129(1): 171-176.
- MacIsaac, E. & Stockner, J.G. (1993). Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy. En Kemp, P., Cole, J., Sherr, B. & Sherr, E. (Eds.). *Handbook of methods in aquatic microbial ecology* (pp. 187-197). Lewis Publishers, Estados Unidos.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. & Clarck, D. (2009). *Brock Biología de los microorganismos*. Pearson Educación, Prentice Hall, Madrid.
- Manter, D.K. & Vivanco, J.M. (2007). Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 71(1): 7-14.
- Marie, D., Zhu, F., Balagué, V., Ras, J. & Vaultot, D. (2006). Eukaryotic picoplankton communities of the Mediterranean Sea in summer assessed by molecular approaches (DGGE, TTGE, QPCR). *FEMS microbiology ecology*, 55(3): 403-415.
- Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (2003). *Bioindicators and biomonitoring*. Elsevier, Amsterdam.
- Means, N.E., Kremer, R.J. & Ramsier, C. (2007). Effects of glyphosate and foliar amendments on activity of microorganisms in the soybean rhizosphere. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 42(2): 125-132.
- Mendelson, J. (1998). Roundup: el herbicida más vendido del mundo. *The ecologist*, 28(5): 23-27.
- Mendez, A.B., Scervine, J.M. & Fodeas, A.M. (2001). Arbuscular Mycorrhizal Population Associated with Natural and Cultivated Vegetation on a Site of Buenos Aires Province, Argentina. *Biol. Fertil. Soils*, 33: 373-381.
- Meriles, J., Vargas Gil, S., Haro, R., March, G. & Guzman, C. (2006). Glyphosate and Previous Crop Residue Effect on Deleterious and Beneficial Soil-borne Fungi from a Peanut, Corn, Soybean Rotations. *Journal of phytopathology*, 154(5): 309-316.

- Merini, L.J., Cuadrado, V., Flocco, C.G. & Giulietti, A.M. (2007). Dissipation of 2, 4-D in soils of the Humid Pampa region, Argentina: a microcosm study. *Chemosphere*, 68(2): 259-265.
- Meyling, N.V. & Eilenberg, J. (2006). Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 113(1): 336-341.
- Miller, R. & Jastrow, J. (2000). Mycorrhizal fungi influence soil structure. (Eds.). *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function* (pp. 3-18). Springer.
- Montecchia, M.S., Correa, O.S., Soria, M.A., Frey, S.D., García, A.F. & Garland, J.L. (2011). Multivariate approach to characterizing soil microbial communities in pristine and agricultural sites in Northwest Argentina. *Applied soil ecology*, 47(3): 176-183.
- Montgomery, H., Monreal, C., Young, J. & Seifert, K. (2000). Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(8): 1207-1217.
- Moreno, M., Arambarri, A. & Perelló, A. (2011). Diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates from the Argentinian wheat growing area: morphocultural and pathogenic analysis. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science*, 1(9): 365-382.
- Moreno, M., Silvestro, L., Bongiorno, F., Forján, H., Manso, L., Cortizo, L. & Arambarri, A. (2013). Caracterización de la comunidad fúngica del suelo agrícola bajo diferentes historias de manejo. *Ministerio de agricultura ganadería y pesca*.
- Moreno, M.V., Pelizza, S.A. & Stenglein S.A. (2014). Caracterización preliminar de la comunidad fúngica de suelos semiáridos de la provincia de La Rioja mediante el uso de PCR-DGGE. XIII Congreso Argentino de Micología-XIII Jornadas Argentinas de Micología-1er. Reunión de la Asociación Micológica Carlos Spegazzini, CABA, Argentina. p 212. LILLOA Vol 51, suplemento. ISSN: 0075-9481.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of

- polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3): 695-700.
- Muyzer, G. & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1): 127-141.
- Nakatsu, C. (2007). Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science Society of America Journal*, 71(2): 562-571.
- Nandhini, B. & Josephine, M.R. (2013). A study on bacterial and fungal diversity in potted soil. *International Journal of Current and Applied Sciences*, 2(2):1-5.
- Nesci, A., Barros, G., Castillo, C. & Etcheverry, M. (2006). Soil fungal population in preharvest maize ecosystem in different tillage practices in Argentina. *Soil and Tillage Research*, 91(1): 143-149.
- Ng, E.L., Bandow, C., Proença, D.N., Santos, S., Guilherme, R., Morais, P.V. & Sousa, J.P. (2014). Does altered rainfall regime change pesticide effects in soil? A terrestrial model ecosystem study from Mediterranean Portugal on the effects of pyrimethanil to soil microbial communities under extremes in rainfall. *Applied soil ecology*, 84(0): 245-253. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.08.006>.
- Nielsen, M.N. & Winding, A. (2002). *Microorganisms as indicators of soil health*. National Environmental Research Institute, Denmark.
- Nocker, A., Burr, M. & Camper, A.K. (2007). Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology*, 54(2): 276-289.
- O'Callaghan, M., Lorenz, N., Gerard, E.M., Cooper, J. & Rao, J. (2006). Characterization of phylloplane and rhizosphere microbial populations using PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Molecular Approaches to Soil, Rhizosphere and Plant Microorganism Analysis*: 99-115.
- Oros-Sichler, M., Gomes, N., Neuber, G. & Smalla, K. (2006). A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE

- analysis of soil fungal communities. *Journal of Microbiological Methods*, 65(1): 63-75.
- Paetz, A. & Wilke, B.-M. (2005). Soil sampling and storage. (Eds.). *Monitoring and Assessing Soil Bioremediation* (pp. 1-45). Springer.
- Palmgren, U., Ström, G., Blomquist, G. & Malmberg, P. (1986). Collection of airborne microorganisms on Nuclepore filters, estimation and analysis CAMNEA method. *Journal of Applied Bacteriology*, 61(5): 401-406.
- Panigatti, J.L. (2010). *Argentina 200 años, 200 suelos*. INTA, Buenos Aires.
- Pankhurst, C., Doube, B.M. & Gupta, V. (1997). *Biological indicators of soil health*. Cab International, Wallingford, UK.
- Parkinson, D. & Williams, S. (1960). A method for isolating fungi from soil microhabitats. *Plant and soil*, 13(4): 347-355.
- Paul, E. & Johnson, R. (1977). Microscopic counting and adenosine 5'-triphosphate measurement in determining microbial growth in soils. *Applied and environmental microbiology*, 34(3): 263-269.
- Paul, E.A. (2006). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic press, New York.
- Paul, E.A., Harris, D., Klug, M.J. & Ruess, R.W. (1999). The determination of microbial biomass. *Standard soil methods for long-term ecological research*: 291-317.
- Pennanen, T., Paavolainen, L. & Hantula, J. (2001). Rapid PCR-based method for the direct analysis of fungal communities in complex environmental samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(4): 697-699.
- Pimentel, D., Harvey, C., Resosudarmo, P., Sinclair, K., Kurz, D., McNair, M. & Saffouri, R. (1995). Environmental and economic costs of soil erosion and conservation benefits. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition*, 267(5201): 1117-1122.
- Pinedo-Rivilla, C., Aleu, J. & Collado, I. (2009). Pollutants biodegradation by fungi. *Current Organic Chemistry*, 13(12): 1194-1214.

- Pizzul, L., del Pilar Castillo, M. & Stenström, J. (2009). Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation*, 20(6): 751-759.
- Ploem, J. & Tanke, H. (1987). *Introduction to fluorescence microscopy*. Oxford University Press, Oxford
- Porras-Alfaro, A., Herrera, J., Natvig, D.O., Lipinski, K. & Sinsabaugh, R.L. (2011). Diversity and distribution of soil fungal communities in a semiarid grassland. *Mycologia*, 103(1): 10-21.
- Porras-Alfaro, A., Herrera, J., Natvig, D.O. & Sinsabaugh, R.L. (2007). Effect of long-term nitrogen fertilization on mycorrhizal fungi associated with a dominant grass in a semiarid grassland. *Plant and soil*, 296(1-2): 65-75.
- Qin, H., Wang, H., Strong, P.J., Li, Y., Xu, Q. & Wu, Q. (2014). Rapid soil fungal community response to intensive management in a bamboo forest developed from rice paddies. *Soil Biology and Biochemistry*, 68(0): 177-184. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.09.031>.
- Ranjard, L., Lejon, D.P., Mougél, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D. & Chaussod, R. (2003). Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 5(11): 1111-1120.
- Rascovan, N., Carbonetto, B., Revale, S., Reinert, M.D., Alvarez, R., Godeas, A.M. & Iannone, L. (2013). The PAMPA datasets: a metagenomic survey of microbial communities in Argentinean pampean soils. *Microbiome*, 1(1): 1-6.
- Ratcliff, A.W., Busse, M.D. & Shestak, C.J. (2006). Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology*, 34(2): 114-124.
- Reddy, C.A. (1995). The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current opinion in Biotechnology*, 6(3): 320-328.
- Reyes Estebanez, M., Heredia Abarca, G. & Gamboa Angulo, M.M. (2008). Perfil biológico de hongos anamórficos del sureste de México. *Revista mexicana de micología*, 28(SPE): 49-56.

- Rillig, M.C. & Steinberg, P.D. (2002). Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? *Soil Biology and Biochemistry*, 34(9): 1371-1374.
- Roesch, L.F., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K., Kent, A.D. & Triplett, E.W. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME journal*, 1(4): 283-290.
- Rohlf, F. (1998). NTSYS-pc. Software versión 2.0. Exeter software, Setauket, New York.
- Romero, M.C., Reinoso, E.H., Kiernan, A.M. & Córdoba, S. (2004). Biodegradation of glyphosate by wild yeasts. *Revista Mexicana de Micología*(19): 45-50.
- Roslycky, E. (1982). Glyphosate and the response of the soil microbiota. *Soil Biology and Biochemistry*, 14(2): 87-92.
- Rozak, D. & Colwell, R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological reviews*, 51(3): 365.
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G. & Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME journal*, 4(10): 1340-1351.
- Rozas, H.R., Echeverria, H.E. & Angelini, H.P. (2011). Niveles de carbono orgánico y ph en suelos agrícolas de las regiones pampeana y extrapampeana argentina. *Ciencia del suelo*, 29: 29-37.
- Sakamoto, K. & Oba, Y. (1994). Effect of fungal to bacterial biomass ratio on the relationship between CO₂ evolution and total soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils*, 17(1): 39-44.
- Scheu, S. & Parkinson, D. (1994). Changes in bacterial and fungal biomass C, bacterial and fungal biovolume and ergosterol content after drying, remoistening and incubation of different layers of cool temperate forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(11): 1515-1525.
- Schlöter, M., Dilly, O. & Munch, J. (2003). Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 98(1): 255-262.

- Schneider, T., Gerrits, B., Gassmann, R., Schmid, E., Gessner, M.O., Richter, A. & Riedel, K. (2010). Proteome analysis of fungal and bacterial involvement in leaf litter decomposition. *Proteomics*, 10(9): 1819-1830.
- Silva, T.M., Stets, M.I., Mazzetto, A.M., Andrade, F.D., Pileggi, S.A., Fávero, P.R. & Pileggi, M. (2007). Degradation of 2, 4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(3): 522-525.
- Silvestro, L.B., Stenglein, S.A., Forjan, H., Dinolfo, M.I., Arambarri, A.M. & Moreno, M.V. (2013). Effect of crop rotation under zero tillage on soil *Fusarium* population. *Spanish J. of Agr. Res*, 11: 72-79.
- Singh, B.K. & Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS microbiology reviews*, 30(3): 428-471.
- Smit, E., Leeflang, P., Glandorf, B., van Elsas, J.D. & Wernars, K. (1999). Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, 65(6): 2614-2621.
- Smith, J. & Paul, E. (1990). The significance of soil microbial biomass estimations. *Soil biochemistry*, 6: 357-396.
- Söderberg, K., Probanza, A., Jumpponen, A. & Bååth, E. (2004). The microbial community in the rhizosphere determined by community level physiological profiles (CLPP) and direct soil and cfu PLFA techniques. *Applied soil ecology*, 25(2): 135-145.
- Solaiman, Z. & Marschner, P. (2007). DGGE and RISA protocols for microbial community analysis in soil. (Eds.). *Advanced techniques in soil microbiology* (pp. 167-180). Springer.
- Stahl, P.D., Parkin, T.B. & Eash, N.S. (1995). Sources of error in direct microscopic methods for estimation of fungal biomass in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(8): 1091-1097.
- Staley, J.T. & Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Reviews in Microbiology*, 39(1): 321-346.

- Stevenson, F. (1986). *Cycles of Soils. C, N, P, S, Micronutrients*. John Wiley and Sons, New York.
- Stevenson, F.J. & Cole, M.A. (1999). *Cycles of soils: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients*. John Wiley & Sons, New York.
- Stratton, G.W. & Stewart, K.E. (1992). Glyphosate effects on microbial biomass in a coniferous forest soil. *Environmental toxicology and water quality*, 7(3): 223-236.
- Studdert, G.A. (2000). Crop rotations and nitrogen fertilization to manage soil organic carbon dynamics. *Soil Science Society of America Journal*, 64(4): 1496-1503.
- Talley, S.M., Coley, P.D. & Kursar, T.A. (2002). The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. *BMC ecology*, 2(1): 7.
- Tanney, J.B. & Hutchison, L.J. (2010). The effects of glyphosate on the in vitro linear growth of selected microfungi from a boreal forest soil. *Canadian journal of microbiology*, 56(2): 138-144.
- Tarback, E.J., Lutgens, F.K. & Tasa, D. (2005). Ciencias de la Tierra. *Una introduc.*
- Taylor, D. (1988). Basic fluorescence microscopy. *Methods in cell biology*, 29: 207-237.
- Tebbe, C.C. & Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and environmental microbiology*, 59(8): 2657-2665.
- Toju, H., Tanabe, A.S., Yamamoto, S. & Sato, H. (2012). High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE*, 7(7).
- Tsuji, T., Kawasaki, Y., Takeshima, S., Sekiya, T. & Tanaka, S. (1995). A new fluorescence staining assay for visualizing living microorganisms in soil. *Applied and environmental microbiology*, 61(9): 3415-3421.

- Tuomela, M., Oivanen, P. & Hatakka, A. (2002). Degradation of synthetic ¹⁴ C-lignin by various white-rot fungi in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(11): 1613-1620.
- van der Wal, A., van Veen, J.A., Smant, W., Boschker, H.T., Bloem, J., Kardol, P. & de Boer, W. (2006). Fungal biomass development in a chronosequence of land abandonment. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(1): 51-60.
- van Eerd, L.L., Hoagland, R.E., Zablotowicz, R.M. & Hall, J.C. (2009). Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Science*, 51(4): 472-495.
- van Elsas, J.D., Duarte, G.F., Keijzer-Wolters, A. & Smit, E. (2000). Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 43(2): 133-151.
- van Veen, J.A. & Paul, E.A. (1979). Conversion of biovolume measurements of soil organisms, grown under various moisture tensions, to biomass and their nutrient content. *Applied and environmental microbiology*, 37(4): 686-692.
- Vargas Gil, S., Meriles, J., Conforto, C., Basanta, M., Radl, V., Hagn, A. & March, G.J. (2011). Response of soil microbial communities to different management practices in surface soils of a soybean agroecosystem in Argentina. *European Journal of Soil Biology*, 47(1): 55-60.
- Varma, A. & Oelmüller, R. (2007). *Advanced techniques in soil microbiology*. Springer, Berlin.
- Vázquez, M. & Bianchinotti, M. (2013). Fungi degrading metsulfuron methyl in agricultural soils of Argentina. *Phyton*, 82: 113-118.
- Vázquez, B., Moreno, V. & Bianchinotti V. (2014). Estimación de la biomasa fúngica de un suelo agrícola del SO Bonaerense usando un método tradicional y uno cultivo-independiente. XIII Congreso Argentino de Micología-XIII Jornadas Argentinas de Micología-1er. Reunión de la Asociación Micológica Carlos Spegazzini, CABA, Argentina. LILLOA Vol 51, suplemento. ISSN: 0075-9481.

- Velazquez, M.S., Cabello, M.N. & Barrera, M. (2013). Composition and structure of arbuscular-mycorrhizal communities in El Palmar National Park, Argentina. *Mycologia*, 105: 509-520.
- Viaud, M., Pasquier, A. & Brygoo, Y. (2000). Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycological Research*, 104(9): 1027-1032.
- Visser, S. & Parkinson, D. (1992). Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture*, 7(1-2): 33-37.
- Vroumsia, T., Steiman, R., Seigle-Murandi, F. & Benoit-Guyod, J.-L. (2005). Fungal bioconversion of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) and 2, 4-dichlorophenol (2, 4-DCP). *Chemosphere*, 60(10): 1471-1480.
- Walters, J. (1999). Environmental fate of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. Environmental Monitoring and Pest Management Department of Pesticide Regulation. <http://cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/24-d.pdf>
- Warcup, J. (1950). The soil-plate method for isolation of fungi from soil. *Nature* 166: 117 - 118
- Wardle, D.A. & Parkinson, D. (1990). Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant and soil*, 122(1): 21-28.
- Watanabe, T. (2002). Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. *Watanabe (ed.), Second Ed. CRC Press, Washington DC*.
- Watson, R. & Blackwell, B. (2000). Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(7): 633-642.
- Weinbauer, M.G., Beckmann, C. & Höfle, M.G. (1998). Utility of green fluorescent nucleic acid dyes and aluminum oxide membrane filters for rapid epifluorescence enumeration of soil and sediment bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 64(12): 5000-5003.
- West, A. (1988). Specimen preparation, stain type, and extraction and observation procedures as factors in the estimation of soil mycelial lengths and volumes by light microscopy. *Biology and fertility of soils*, 7(1): 88-94.

- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18: 315-322.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C. & Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12): 6578-6583.
- Wijnand, E., Blomquist, G., Nielsen, B.H. & Heldal, K.K. (2001). Recognition errors in the quantification of micro-organisms by fluorescence microscopy. *Annals of Occupational Hygiene*, 45(6): 493-498.
- Wilding, L.P., Smeck, N.E. & Hall, G.F. (1983). *Pedogenesis and Soil Taxonomy: Concepts and Interactions: Concepts and Interactions*. Elsevier, New York.
- Yang, D. & Zhang, M. (2014). Effects of land-use conversion from paddy field to orchard farm on soil microbial genetic diversity and community structure. *European Journal of Soil Biology*, 64(0): 30-39. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.07.003>.
- Yannarell, A.C. & Triplett, E.W. (2005). Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Applied and environmental microbiology*, 71(1): 227-239.
- Yaron, B., Calvet, R. & Prost, R. (1996). *Soil pollution: processes and dynamics*. Springer, Berlin.
- Yu, Y.L., Wang, X., Luo, Y.M., Yang, J.F., Yu, J.Q. & Fan, D.F. (2005). Fungal degradation of metsulfuron-methyl in pure cultures and soil. *Chemosphere*, 60(4): 460-466.
- Zabaloy, M.C., Garland, J.L. & Gómez, M.A. (2008). An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2, 4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied Soil Ecology*, 40(1): 1-12.
- Zabaloy, M.C., Gómez, E., Garland, J.L. & Gómez, M.A. (2012). Assessment of microbial community function and structure in soil microcosms exposed to glyphosate. *Applied Soil Ecology*, 61: 333-339.

- Zabaloy, M.C., Zanini, G.P., Bianchinotti, V., Gomez, M.A. & Garland, J.L. (2011). Herbicides in the Soil Environment: Linkage Between Bioavailability and Microbial Ecology in Herbicides Theory and applications. *www.intechopen.com*.
- Zhao, X.R., Lin, Q. & Brookes, P.C. (2005). Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass? *Soil Biology and Biochemistry*, 37(2): 311-317. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.041>.
- Zhu, F., Massana, R., Not, F., Marie, D. & Vaultot, D. (2005). Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(1): 79-92.