

## EFFECTOS DEL GLIFOSATO SOBRE MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS Y NITRIFICANTES EN ECOSISTEMAS ALTO ANDINO Y SECO TROPICAL COLOMBIANOS

Por Patricia Martínez-Nieto, Jaime Bernal-Castillo y Lorena Romero-Torres

[patingli@gmail.com](mailto:patingli@gmail.com)

Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana - Bogota, Colombia

### RESUMEN

En ecosistemas Alto Andino y Seco Tropical se evaluó el efecto del glifosato sobre microorganismos involucrados en el Ciclo del Nitrógeno (diazotróficos y nitrificantes) Se examinaron dosis de glifosato de 3,1 L·ha<sup>-1</sup> y 10,4 L·ha<sup>-1</sup>. El crecimiento microbiano se determinó mediante el Número Más Probable a las 0 h, 48 h y 192 h. Los resultados muestran que en el ecosistema Alto Andino hay disminución, hasta las 48 horas, tanto de las poblaciones microbianas fijadoras de nitrógeno como de las oxidantes de amonio. A las 192 h hubo restablecimiento de las diazotróficas, pero decrecimiento de las poblaciones oxidantes de amonio, con dependencia en la concentración del glifosato. En el ecosistema Seco Tropical, las fluctuaciones microbianas, no fueron afectadas por la aplicación del glifosato, a excepción de las oxidantes de amonio, las cuales disminuyeron su población a medida que se incrementaba la dosis. En la segunda fase de la nitrificación, el comportamiento fue independiente de la presencia del herbicida, en el ecosistema Alto Andino; no así, en el Bosque Seco Tropical, en donde se presentó mayor decrecimiento a las 48 h. Los efectos del glifosato sobre la mayoría de las poblaciones microbianas investigadas fueron temporales y dependientes del ecosistema y dosis aplicadas del herbicida.

Palabras clave: Diazotrófico; Nitrificante; Ecosistema Alto Andino; Ecosistema Seco Tropical.

## EFFECTS OF GLYPHOSATE ON DIAZOTROPHS AND NITRYING BACTERIA IN COLOMBIA'S HIGH ANDEAN AND TROPICAL DRY ECOSYSTEMS

### ABSTRACT

The effect of glyphosate on micro-organisms involved in the nitrogen cycle (diazotrophs and nitrifying bacteria), in High Andean and Tropical Dry ecosystems, was assessed. Glyphosate doses of 3.1 L·ha<sup>-1</sup> and of 10.4 L·ha<sup>-1</sup> were assayed. Microbial growth was determined, by the Most Probable Number method at 0 h, 48 h, and 192 h. Results show that for the High Andean ecosystem, a reduction occurs up to the 48<sup>th</sup> h in the nitrogen-fixing and ammonium-oxidizing microbial populations. After 192 h, re-establishment of the diazotrophic microorganisms occurred, but the ammonium-oxidizing population reduced, depending on the glyphosate concentrations. In the Tropical Dry ecosystem, the microbial fluctuations were not affected by the glyphosate, with the exception of the ammonium-oxidizing bacteria, which decreased as the dose was increased. During the second nitrification, the behavior was herbicide-independent in the High Andean ecosystem; but in the Dry Tropical Forest, the largest decrease occurred at the 48<sup>th</sup> h. The effects of glyphosate on the majority of microbial populations were temporal and its dependent ecosystem and the dose of herbicide.

Key words: Diazotrophs; Nitrifying bacteria; High Andean ecosystems; Tropical Dry ecosystems.

## INTRODUCCIÓN

Los herbicidas que contienen como ingrediente activo el glifosato o N, N-bis(fosfonometil)glicina son sistémicos, de amplio espectro y de post-emergencia. Actúan inhibiendo la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa, esencial en plantas y microorganismos para la producción de aminoácidos aromáticos. Tales herbicidas se han utilizado por varias décadas en la agricultura colombiana y desde 1992 en erradicación de cultivos ilícitos. Algunos productos comerciales a base de glifosato, contienen surfactantes del tipo POEA (polioxietilenaquilaminas) que aumentan la toxicidad, de ligera (IV) a moderada (III) Por recomendación de la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos (2002), la formulación del herbicida glifosato para la erradicación de cultivos ilícitos se modificó, en busca de toxicidad menor para los ojos de las personas que realizan la mezcla y cargan los aspersores. La nueva fórmula contiene 41% de sal de glifosato y 59% de ingredientes inertes; se clasifica con toxicidad III en cuanto a irritación ocular primaria y categoría IV para toxicidad dérmica y oral aguda (Ruiz, 2001; Clínica de Toxicología “Uribe Cualla”, 2001; EPA, 2003; Dirección Nacional de Estupefacientes, 2004; Wiersema *et al.*, 2006)

Los resultados de los estudios sobre el efecto del herbicida glifosato en el ambiente, son en la mayoría de veces, contradictorios. Algunos autores (Vargas *et al.*, 2002; Monsanto, 2005; Guiseppe *et al.*, 2006) no han encontrado efectos sobre los componentes biológicos del suelo; otros, (De Andrea *et al.*, 2003; Zablutowicz y Reddy, 2004; Kremer *et al.*, 2005; Damin y Trivelin, 2010) aseguran que sí los hay. Las consecuencias negativas sobre la fertilidad de los suelos por el aumento del uso de herbicidas, se derivan entre otros factores, de las perturbaciones que producen a la microbiota edáfica, bien sea por acción directa, o consecuente de la eliminación de las plantas (Whitelaw *et al.*, 2004). La acción de los herbicidas está influenciada por sus características fisicoquímicas, formulación y método de aplicación.

Algunos investigadores han encontrado efectos inhibitorios sobre la enzima nitrogenasa y nodulación de bacterias fijadoras de nitrógeno como decrecimiento en la tasa de nitrificación en suelos y sedimentos acuáticos con diferentes dosis de formulaciones comerciales a base de glifosato; mientras otros, han concluido que este herbicida, usado según recomendaciones técnicas, no causa toxicidad a la microbiota edáfica que participa en estas etapas del ciclo de nitrógeno (Carlisle y Trevors, 1986; Olson y Lindwall, 1991; Stratton y Stewart, 1991; Silver y Riley, 2001; Zablutowicz y Reddy, 2004; Enrich-Prast, 2006; Zobiole *et al.*, 2010)

En Colombia se han publicado algunas investigaciones (Mendoza *et al.*, 1999; Cuervo, 2007) sobre el impacto del glifosato en bacterias, hongos, actinomicetos y en el proceso de nitrificación. Debido al retardo en el desarrollo de la nitrificación o su inhibición, a concentraciones altas de Roundup® en cultivos bananeros, Mendoza *et al.*, (1999) recomiendan la evaluación de las poblaciones microbianas involucradas en la fertilidad del suelo cuando se utilice este herbicida. Por otro lado, Agudelo *et al.*, (2004) y Cuervo (2007) han encontrado microorganismos que resisten altas dosis de este herbicida hasta del 8 %, en suelos ganaderos y arroceros.

En el estudio de la Organización de los Estados Americanos (OEA) para Colombia (Solomon *et al.*, 2005), relacionado con el impacto sobre la microbiota edáfica de las fumigaciones aéreas con glifosato, en dosis normales de campo y especiales para el control de cultivos de coca y amapola, se asevera que hay poca probabilidad de efectos adversos sobre los microorganismos del suelo.

En la presente investigación se establece un punto de partida para evaluar el efecto del glifosato sobre los microorganismos que intervienen en la fijación de nitrógeno y la nitrificación, etapas del ciclo biogeoquímico del nitrógeno; estas variables están contempladas en el monitoreo ambiental de suelo, dispuesto en el Plan de Manejo Ambiental del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la Resolución 1054/2003 del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial Colombiano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo

Se escogieron cuatro zonas, dos pertenecientes al ecosistema Alto Andino (sub-páramo) y dos a Seco Tropical, en los municipios de Zipaquirá (Cundinamarca) y Ambalema (Tolima) respectivamente. Las áreas de Cundinamarca fueron bosque secundario y cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), ambas a una altitud promedio de 3.200 m.s.n.m con una latitud de 0.5° 05' 18.5" y una longitud de 74° 01' 31.7". En Tolima se seleccionó un ecosistema Seco Tropical, donde se tomaron muestras de bosque secundario y cultivo de arroz (*Oryza sativa*), hallados a una altitud promedio de 240 m.s.n.m, latitud de 4° 44' 44.9" y una longitud de 74° 48' 50.5" (Figura 1)

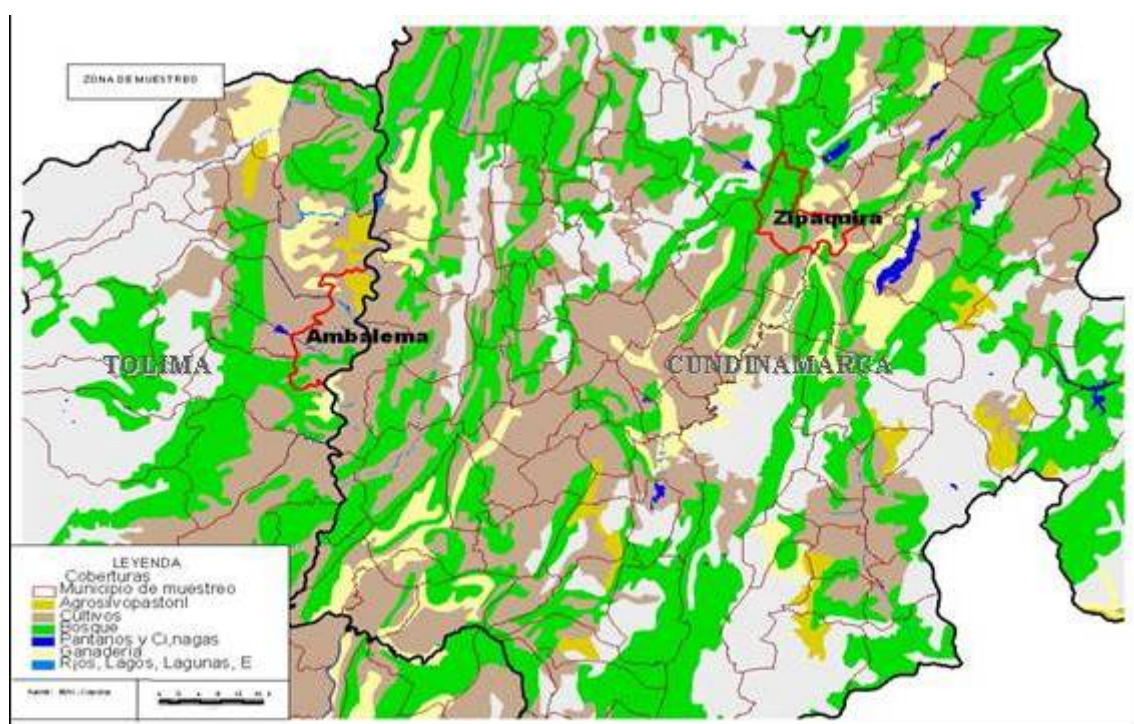


Figura 1. Mapa que muestra los municipios de Zipaquirá y Ambalema ubicados respectivamente en los departamentos colombianos de Cundinamarca y Tolima donde se tomaron las muestras de suelo

Las características fisicoquímicas de los suelos muestreados se observan en la tabla I, estos análisis fueron realizados por la Universidad Nacional de Colombia y el laboratorio de suelos de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), a partir de muestras recolectadas de acuerdo con la norma técnica colombiana 3656 (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC), 1994), tomando por zona 15 sub-muestras de suelo a una profundidad de 5 cm mediante un muestreo al azar con recorrido en zig-zag.

Tabla I. Análisis fisicoquímicos de suelos muestreados en las áreas de bosque y cultivos pertenecientes a los ecosistemas Seco Tropical y Alto Andino.

Análisis	Unidad	Ecosistemas			
		Seco Tropical		Alto Andino	
		Bosque	Arroz	Bosque	Papa
Textura		Arcillosa	Arcillosa	Limosa	Franco arenosa
pH		6.7	6.1	4.2	4.9
Materia orgánica	%	1.83	2.21	29.9	13.14
Nitrógeno	%	0.16	0.19	1.49	1.13
Fósforo	mg Kg <sup>-1</sup>	135.8	45.7	9	23.8
Al+ H	cmol Kg <sup>-1</sup>	0.05	0.05	11.4	2.28
SAT Al	%	-	-	72.3	-
Calcio	cmol Kg <sup>-1</sup>	23.33	18.70	0.6	1.58
Magnesio	cmol Kg <sup>-1</sup>	7.29	8.53	0.5	0.21
Potasio	cmol Kg <sup>-1</sup>	0.72	1.09	0.46	0.30
Sodio	cmol Kg <sup>-1</sup>	0.60	1.19	0.2	0.10
CIC	cmol Kg <sup>-1</sup>	26.6	31.3	13.1	45.5
Hierro	mg Kg <sup>-1</sup>	82	169	990	91
Cobre	mg Kg <sup>-1</sup>	3.4	4.9	0.7	0.7
Manganeso	mg Kg <sup>-1</sup>	16.4	25.7	12.6	0.6
Zinc	mg Kg <sup>-1</sup>	5.0	8.1	6.5	1.0
Boro	mg Kg <sup>-1</sup>	0.31	0.2	0.18	0.6

Evaluación *in vitro* para determinar cambios poblacionales microbianos en el ciclo del nitrógeno, por la aspersión con glifosato

**Manejo de los suelos muestreados.** Las quince muestras tomadas, tanto del suelo en bosque secundario como de los cultivos agrícolas, se mezclaron homogéneamente, con el fin de constituir una muestra compuesta por área estudiada. Se tomaron 2.034 g de suelo por cada una de las cuatro zonas (bosque Alto Andino, cultivo de papa, bosque Seco tropical y cultivo de arroz) y se dividieron equitativamente en bandejas, hechas de espuma de poliestireno, de 100 cm<sup>2</sup> de área superficial, con un contenido unitario de 226 g de muestra.

**Dosis de Glifosato.** El glifosato examinado fue el componente activo del producto comercial denominado Roundup ® SL (aquí abreviado como Rp, y distribuido en Colombia por la Compañía Agrícola Colombiana Ltda.). Esta sustancia contiene al glifosato en forma de sal de isopropilamina, con una concentración de 480 g·L<sup>-1</sup>. Las dosis escogidas fueron la normalmente empleada en los cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.), 3,1 L·ha<sup>-1</sup> (Dosis1) y aquella utilizada en la erradicación de cultivos de coca (*Erythroxylon coca*), 10,4 L·ha<sup>-1</sup> (Dosis 2). Estas se convirtieron a mL·m<sup>2</sup>, pero debido a que los volúmenes de mezcla eran muy pequeñas, para ser manipuladas en el área de experimentación, se diluyeron cien veces, lo que permitió aspersión repetida, pero conservando las concentraciones de las dosis descritas anteriormente. Es importante anotar que para los cálculos de mezcla, se tuvo en cuenta la cantidad de agua adicionada por los arroceros (55 L·ha<sup>-1</sup>) y por la Policía Antinarcóticos Colombiana (13,02 L·ha<sup>-1</sup>). Al final para la aplicación a un m<sup>2</sup>, se debieron mezclar 5,34 mL y 44,41 mL de Rp y completar con agua para obtener 100 mL de solución acuosa para las dosis 1 y 2 respectivamente.

**Distribución del diseño experimental.** Las unidades experimentales utilizadas, fueron los

suelos previamente mezclados, provenientes de las cuatro zonas muestreadas y distribuidos en las bandejas de espuma de poliestireno. Se tomaron como tratamientos los montajes resultantes de la adición de las dos dosis de Rp (D1 y D2) a las unidades experimentales y como controles (C) los suelos sin ninguna aplicación. La experimentación siguió un diseño completamente al azar con arreglo factorial, con tres repeticiones por tratamiento, con lo que se obtuvo un total de 36 unidades experimentales (9 unidades por cada zona muestreada dentro del ecosistema o sea en total 18 por cada uno de los dos ecosistemas)

*Método de aspersión.* Se tomó una hoja de papel absorbente (tipo periódico) de 100 cm de largo por 100 cm de ancho y se colocó en su centro una bandeja que contenían los 226 g de suelo y sobre ésta se asperjaron los 100 mL de la solución con nebulizador, asegurando su distribución uniforme en el área total del m<sup>2</sup> cubierto por el papel. El mismo procedimiento se repitió con cada unidad experimental de los tratamientos a los que se les debía adicionar la mezcla acuosa del herbicida.

*Parámetros evaluados.* La estimación de la población microbiana que interviene en la fijación de nitrógeno y nitrificación se realizó en tres momentos: un instante antes de la aspersión de Rp (t = 0 h), después de 48 h y 192 h de esta acción. Se determinó la densidad poblacional microbiana de nitrificantes y fijadoras de nitrógeno mediante la técnica de Número Más Probable (NMP), empleando medios selectivos de crecimiento de acuerdo con el grupo fisiológico y pruebas diagnósticas específicas; siguiendo las metodologías de Novo *et al.* (1989), Deni y Penninckx (1999) y Miyamoto *et al.* (2004)

Para el cultivo de Nitrificantes se emplearon los caldos Amoniacal y Nitrito, haciendo las lecturas con los reactivos de Griess y difenilamina-sulfúrica, para poblaciones oxidantes de amonio y de nitrito, respectivamente (Novo *et al.*, 1989; Deni y Penninckx, 1999). En la siembra de las diluciones seriadas para el conteo de microorganismos fijadores libres de nitrógeno se utilizó un medio semisólido libre de nitrógeno y los tubos se reemplazaron con un 10 % de acetileno y se leyeron en un Cromatógrafo de Gases (PERKIN-ELMER 3920 B), para evidenciar la presencia de etileno. Un pico correspondiente a este gas, muestra la actividad de la enzima nitrogenasa presente en los microorganismos fijadores de nitrógeno al reducir el acetileno a etileno (Miyamoto *et al.*, 2004). Para los recuentos por el método NMP se emplearon las tablas estadísticas de Mac Crady (Novo *et al.*, 1989)

*Análisis estadístico.* Se empleo para este diseño un Análisis de Varianza de cuatro factores. La diferencia entre tratamientos se hizo mediante la Prueba de Rango Múltiple de Duncan a un nivel de significancia de 0,05 (Steel *et al.*, 1997)

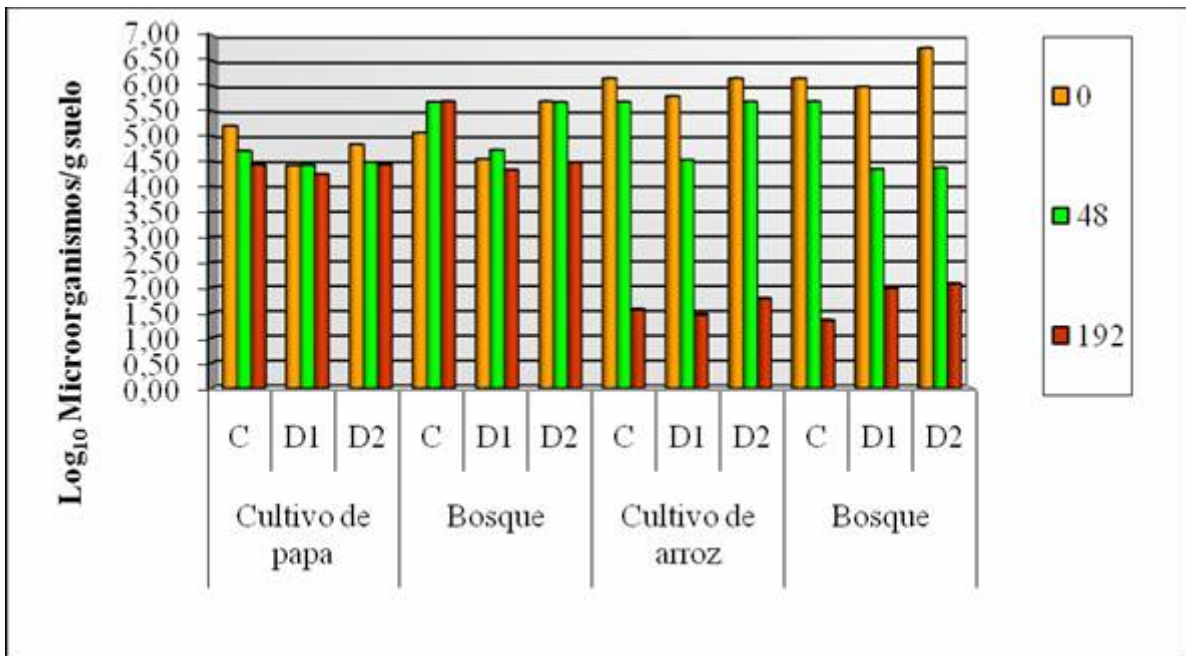
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación *in vitro* para determinar cambios poblacionales microbianos en el ciclo del nitrógeno, por la aspersión con glifosato

*Poblaciones microbianas nitrificantes.* Los microorganismos que intervienen en esta etapa se dividen en dos grupos, los oxidantes del amonio y del nitrito. Estos presentaron diferencias significativas en la respuesta a la aspersión con Rp en los dos ecosistemas en dependencia de las dosis y tipo de cobertura vegetal, con  $P= 0,0214$  y  $0,0213$  para la microbiota oxidante de amonio y de nitrito respectivamente. El comportamiento de las poblaciones oxidantes de amonio en los suelos de las dos zonas analizadas pertenecientes al ecosistema Alto Andino, fue dependiente de las concentraciones aplicadas de Rp en las primeras 48 h. En el área cultivada se observó disminución de poblaciones en los suelos asperjados y en los controles, pero los decrecimientos fueron mayores a medida que aumentó la concentración del herbicida. En el bosque secundario los suelos sin aspersión mostraron aumento de estas poblaciones, pero estas fueron disminuyendo en relación con la dosis aplicada de Rp (Figura 2). Al final de la evaluación en los cultivos de papa (ocho días), se

observó que el declive de los microorganismos oxidantes de amonio fue mayor en los suelos control, lo que indica influencia de factores diferentes a la aplicación del herbicida. Este comportamiento es contrario a lo presentado en bosque Alto Andino, cuyos suelos sin aspersión mostraron aumento de estas poblaciones; mientras que en aquellos que recibieron las dosis de glifosato se produjo reducción, tendencia que se acentuó con la mayor concentración del herbicida. Lo anterior demuestra influjo del herbicida sobre la cantidad de microorganismos de la cobertura de bosque que participan en esta etapa, la cual bajó notoriamente a medida que aumentaba la concentración del Rp.

A las 48 h, en el ecosistema Seco Tropical, los cultivos de arroz mostraron disminución de las poblaciones oxidantes de amonio, pero sin guardar concordancia con las dosis de Rp (figura 2). En todos los suelos de bosque Seco Tropical, también se evidenció disminución de los recuentos microbianos, pero a diferencia del área cultivada, a las 48 h, esta tendencia muestra vínculo con la cantidad del glifosato, siendo mayor con la dosis más alta (figura 2). A los ocho días, el declive microbiano no se relacionó con las concentraciones asperjadas del herbicida, siendo mayor en los suelos no aplicados (figura 2)



$P=0,0214$

Figura 2. Dinámica poblacional de microorganismos oxidantes de amonio, antes de la aspersión, a las 48 horas y ocho días de aplicado el herbicida en los ecosistemas Alto Andino y Seco Tropical.

En la segunda etapa de la nitrificación, las poblaciones microbianas que oxidan nitrito para producir nitrato, el impacto por la aplicación de glifosato fue menor, mostrando solamente en Bosque Seco Tropical dependencia a la presencia del herbicida a las 48 h, manifestando una disminución mayor a medida que se incrementaba la dosis del herbicida (Figura 3)

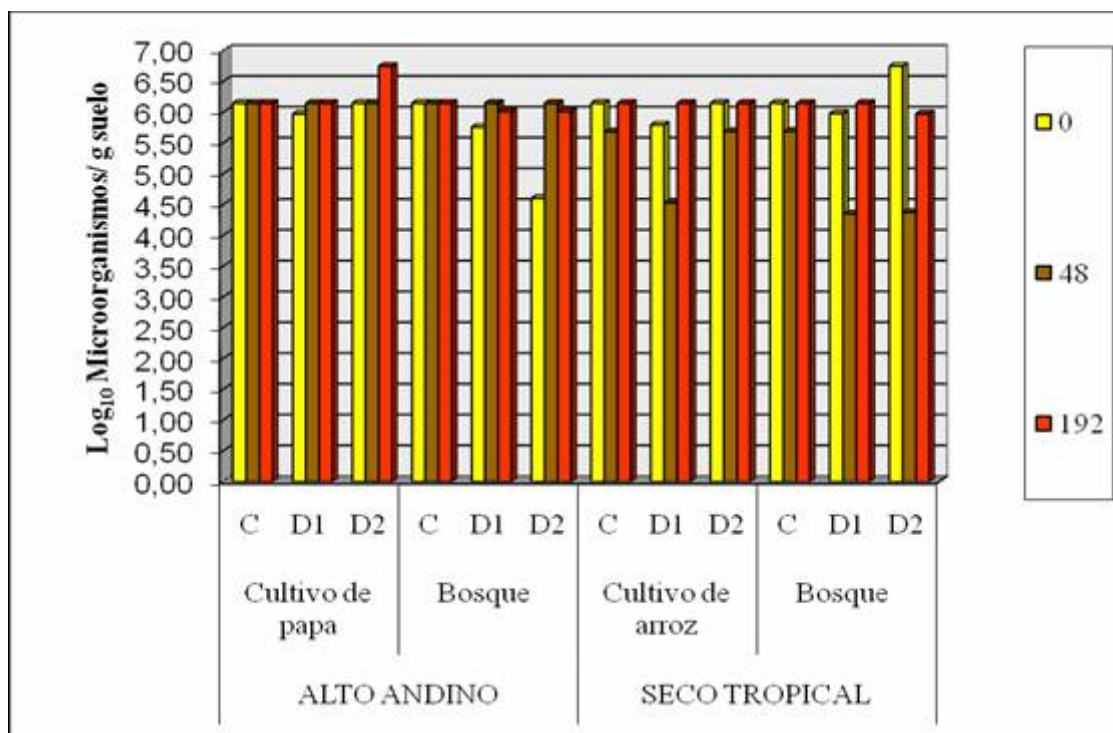


Figura 3. Comportamiento de las poblaciones de microorganismos oxidantes de nitrito a la aspersión con glifosato en los ecosistemas Alto Andino y Seco Tropical.

A los ocho días de realizada la aplicación del herbicida, en la mayoría de los suelos, las poblaciones oxidantes de nitrito, se incrementaron o permanecieron iguales, independientemente de las intensidades usadas del principio activo. Solamente en los suelos del Bosque Alto Andino, mientras el número de microorganismos permaneció constante en el control, en los demás tratamientos se presentó una disminución, pero este declive no se incrementó al aumentar la dosis.

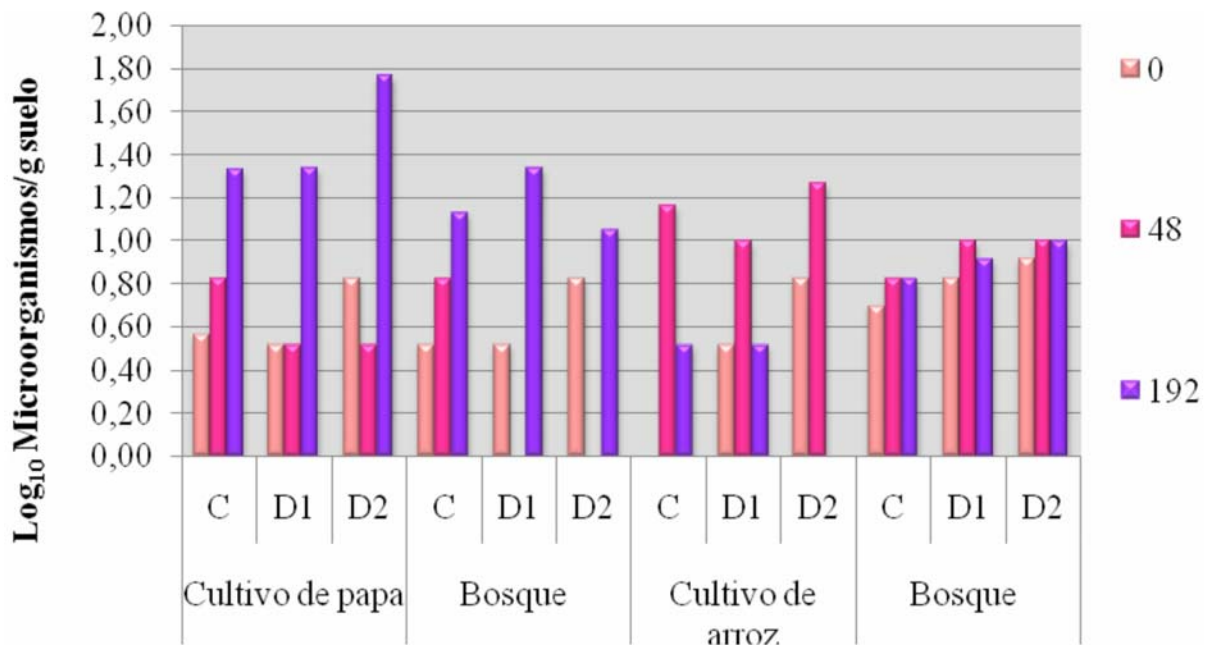
Al comparar las dos fases de la nitrificación (Figuras 2 y 3) se advirtió, cómo los microorganismos que oxidan amonio son más sensibles a la acción del herbicida; sin embargo, la disminución a los ocho días, aparentemente, ya no son debidas a la aplicación del Rp, a excepción de los suelos provenientes del Bosque Alto Andino. Se ha afirmado que algunos pesticidas pueden disminuir la producción de nitrato por inhibición o disminución de las poblaciones de las bacterias oxidantes de amonio. El glifosato por encima de  $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  afectó la tasa de nitrificación en muestras de sedimento del lago Braband en Dinamarca (Milton, 2001; Enrich-Prast, 2006). Los decrecimientos poblacionales, sin interferencia del herbicida, pueden ser debidos a la influencia de factores ambientales y a las características de los suelos. Es importante anotar, que el proceso de nitrificación es muy sensible a la temperatura, humedad, pH y al contenido de amonio en el suelo. En suelos con pH por debajo de 5,5 como los encontrados en el ecosistema Alto Andino muestreado, la nitrificación es igual o excede a los suelos con pH neutros, aunque paradójicamente el crecimiento de las bacterias que oxidan el amonio a nitrito en laboratorio muestra inhibición por debajo de pH 6,3, pero la explicación para que no se afecte la nitrificación en estos ambientes se debe a la presencia de microorganismos autótrofos nitrificantes pertenecientes al filo *Thaumarchaeota* que participan en la oxidación de amonio en suelos con pH de 4,5 (Scott y Carreiro, 2000; Milton, 2001; Lehtovirta-Morley *et al.*, 2011)

Algunos investigadores han encontrado inhibición de la nitrificación con el herbicida Rp, cuando se emplean concentraciones por encima de las tasas recomendadas (Carlisle y Trevors, 1986; Stratton y Stewart, 1991; Busse *et al.*, 2001); mientras que, Olson y Lindwall (1991) utilizando 3 y 10 veces las dosis aconsejadas de Rp en campo, no hallaron ningún efecto sobre ese proceso. En suelos de una zona bananera colombiana, se encontró que a concentraciones de 100 y 1000 ppm había inhibición, estadísticamente significativa, del proceso de nitrificación, con un retardo inicial de cuatro días (Mendoza *et al.*, 1999). Carlisle y Trevors (1986) mostraron que el glifosato puede

estimular o inhibir los organismos del suelo dependiendo del tipo de suelo o de la concentración del compuesto.

*Poblaciones microbianas fijadoras de nitrógeno.* En el ecosistema Alto Andino, a las 48 h desde la aspersión del Rp, se observó disminución del número de microorganismos fijadores de nitrógeno, a medida que aumentaba la concentración de glifosato, valor que se restablece a los ocho días (Figura 4); sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $P=0,084$ ). El anterior comportamiento podría indicar adaptación al herbicida y/o biodegradación del mismo; ya que, se han reportado algunas especies fijadoras de nitrógeno como degradadores de glifosato y de otros compuestos del tipo fosfonato (Liu *et al.*, 1991; Moneke *et al.*, 2010)

A diferencia del ecosistema Alto Andino, el Seco Tropical, a las 48 horas, presenta un incremento de las poblaciones microbianas; pero posteriormente, al final del experimento se observó un declive; sin embargo, en ninguno de los dos casos fue debido a la fumigación con Rp (Figura 4)



$P= 0,084$

Figura 4. Variaciones poblacionales de microorganismos diazotróficos en los ecosistemas Alto Andino y Seco Tropical, durante ocho días de evaluación.

En estudios de invernadero, la actividad de la nitrogenasa de *Bradyrhizobium japonicum* fue inhibida transitoriamente en etapas tempranas de desarrollo; no obstante, las reducciones en campo de la fijación, no fueron plenamente demostradas (Zablotowicz y Reddy, 2004). Otras investigaciones han encontrado inhibición en campo a concentraciones de Roundup Ultra, de 1,68 kg·ha<sup>-1</sup> de ingrediente activo, como también *in vitro* a concentraciones de 0,5 a 5 mM (King *et al.*, 2001; Zablotowicz y Reddy, 2004). Bajo condiciones de laboratorio, se ha hallado inhibición del proceso de fijación de nitrógeno en bacterias fijadoras de vida libre como *Azotobacter chroococcum* y *A. vinelandii*, (Santos y Flores, 1995). Carlisle y Trevors (1986) encontraron que la reducción de acetileno fue inhibida a altas concentraciones del herbicida Rp ®; mientras que Hernández *et al.* (1999), aseguran que hay reducción de la actividad de la nitrogenasa a concentraciones por encima de 30 µM y acumulación de ácidos de los tipos fenólicos y shikimato en hojas y nódulos, en dosis superiores a 3 mM. Hoagland *et al.* (1999), citado por Oko Institute (2000) hallaron disminución de la fijación de nitrógeno en los nódulos de soya transgénica, lo mismo que Zobiolo *et al.* (2010) por disminución del níquel disponible esencial para la fijación biológica independiente del tipo de suelo;



a diferencia de lo encontrado por Dos Santos *et al.* (2006) quienes sostienen que no se afecta la nodulación por los diazotróficos *Bradyrhizobium elkanii* y *B. japonicum*, con la aplicación de 10 L·ha<sup>-1</sup> de Rp antes de la siembra de soya. De acuerdo con estos investigadores, la variabilidad de los resultados encontrados en diversas investigaciones, se deben a las especies estudiadas, dosis aplicadas, condiciones experimentales y medios empleados.

## CONCLUSIONES

Los efectos del glifosato sobre la mayoría de las poblaciones de microorganismos que intervienen en el ciclo del nitrógeno fueron temporales y dependieron del ecosistema, la zona muestreada dentro de este y las dosis aplicadas. Estos resultados sugieren la necesidad de seguir investigando en otros tipos de suelos colombianos y de grupos funcionales microbianos, importantes para la nutrición y regulación edáfica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos. 2003. Uso de Pesticidas en el Programa de Erradicación de cultivos de Coca y de Amapola en Colombia. Disponible en: <http://www.state.gov/documents/organization/27516.pdf>
- Agudelo, E., Bernier S., Bernal-Castillo, J. y Martínez Nieto, P. 2004. Evaluación de la capacidad degradadora del herbicida glifosato por bacterias nativas aisladas de una finca ganadera en Facatativa, Cundinamarca. Disponible en: <http://www.humboldt.org.co/chmcolombia/servicios/jsp/proyectos/Listados.jsp?desde=0&hasta=10&textobuscar=glifosato&conector=AND&textobuscar2=Degradacion&dpto=13&Submit2=Buscar>
- Busse, M.D., Ratcliff, A.W., Shestak, C.J. and Powers, R. F. 2001. Glyphosate toxicity and the effect on long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 33 (12): 1777-1789.
- Carlisle, S. M. and Trevors, J. T. 1986. Effect of the herbicide glyphosate on nitrification, denitrification and reduction acetylene in soil. *Water Air and Soil Pollution*, 29 (2):189-204.
- Clínica De Toxicología “Uribe Cualla”. 2001. Supuestos efectos del glifosato en la salud humana. Informe Final. Disponible en: <http://www.ciponline.org/colombia/wwwfseg1.pdf>
- Cuervo, J. 2007. Comportamiento del glifosato en suelos arroceros del departamento del Tolima - Colombia y su actividad sobre la biota microbial del suelo. Disponible en: <http://www.unal.edu.co/dib/launinvestiga/conferencias20070419.html>
- Damin, V. and Trivelin, P.C.O. 2010. Herbicides Effect on Nitrogen Cycling in Agroecosystems. Disponible en: [www.intechopen.com/download/pdf/pdfs\\_id/12684](http://www.intechopen.com/download/pdf/pdfs_id/12684)
- Deni, J. and Penninckx, M. J. 1999. Nitrification and Autotrophic Nitrifying Bacteria in a Hydrocarbon-Polluted Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9): 4008-4013.
- Dirección Nacional de Estupefacientes. 2004. Los cultivos Ilícitos en Colombia, Subdirección de Asuntos Regionales y Erradicación. Disponible en: <http://www.dne.gov.co/?idcategoria=1220#>
- Dos Santos, J., Siqueira, J. O. and De Souza, F. M. 2006. Effects of glyphosate on soybean symbiotic microorganisms, in culture media and in greenhouse. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41 (2): 285-291.
- Enrich-Prast, A. 2006. Effect of Pesticides on Nitrification in Aquatic Sediment. *Brazilian Journal of Biology*, 66 (2A): 405-412.
- Guiseppe, K. F., F. A. Drummond, C. Stubbs and Woods, S. 2006. The Use of Glyphosate Herbicides in Managed Forest Ecosystems and Their Effects on Non-Target Organisms with Particular Reference to Ants as Bioindicators. Technical Bulletin, 192. Disponible en: [http://www.umaine.edu/mafes/elec\\_pubs/techbulletins/tb192.pdf](http://www.umaine.edu/mafes/elec_pubs/techbulletins/tb192.pdf)
- Hernández, A., García-Plazaola, J. I. and Becerril, J. M. 1999. Glyphosate Effects on Phenolic Metabolism of Nodulated Soybean (*Glycine max* L. Merr). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (7): 2920 -2925.
- Instituto Colombiano de Normas técnicas y Certificación (ICONTEC). 1994. Norma Técnica Colombiana 3656. Toma de muestras de suelo para determinar contaminación. Gestión Ambiental. ICONTEC. Bogotá, Colombia. 9 p.
- King, C. A., Purcell L. C. and Vories, E. D. 2001. Plant Growth and Nitrogenase Activity of Glyphosate-Tolerant Soybean in Response to Foliar Glyphosate Applications. *Agronomy Journal*, 93:179-186.
- Kremer, R., Means N. and Kim, S. 2005. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere microorganisms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 85 (15): 1165-1174.
- Krutz, L. J., Senseman, S. A. and Haney, R. L. 2003. Effect of Roundup Ultra on Atrazine Degradation in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 38:115-118.
- Lehtovirta-Morley, L., Stoecker K., Prosser J. I., Graeme, W. N. 2011. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (37).

- Liu, C. M., Malean P. A., Sookdeo, C. C. and Cannon, F. C. 1991. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family *Rhizobiaceae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1799-1804.
- Mendoza-Meza, D. L., Peña, J. y Franco, A. 1999. Efecto del glifosato y Paraquat sobre el proceso de nitrificación en un suelo del corregimiento de Río Frío (Magdalena). *Revista Colombiana de Química*, 28 (1): 87-96.
- Milton, N. 2001. Bacteria transform ammonium to nitrate in soil. *Soils are Alive Newsletter*, 2 (1): 1-2. Disponible en: [www.soilhealth.com/newsletter/saAlive2001\\_v1.pdf](http://www.soilhealth.com/newsletter/saAlive2001_v1.pdf)
- Miyamoto, T., Kawahara, M. and Minamisawa, K. 2004. Novel Endophytic Nitrogen- Fixing Clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (11): 6580-6586.
- Moneke, A.N., Opkala, G.N. and Anyanwu, C. U. 2010. Biodegradation of Glyphosate herbicide *in vitro* using bacterial isolates from four rice field. *African Journal of Biotechnology*, 9 (26): 4067-4074.
- Monsanto. 2005. Summary of Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® herbicide. Disponible en: [http://www.monsanto.com/monsanto/content/products/productivity/roundup/ecotoxicological\\_risk.pdf](http://www.monsanto.com/monsanto/content/products/productivity/roundup/ecotoxicological_risk.pdf)
- Novo, R., Quintana, E., Valdez R. y Carone, M. 1989. *Folleto de práctica en Microbiología Agrícola*. Empresa de producción y servicio del Ministerio de Educación Superior. La Habana. Cuba.
- Okoln Institute, 2000. Genetic Engineering Newsletter 17. Disponible en: <http://www.biogene.org/e/e-indexx.html>
- Olson, B.M. and Lindwall, C.W. 1991. Soil microbial activity under chemical fallow conditions: Effect of 2, 4-D and glyphosate. *Soil Biology and Biochemistry*, 23 (11):1071-1076.
- Ruiz, I. C. 2001. Clasificación Toxicológica del glifosato y de todas sus formulaciones. Salud Pública. Ministerio de Salud. Carta enviada a la Subdirección de Licencias del Ministerio del Medio Ambiente colombiano. Bogotá, Colombia.
- Santos, A. and Flores, M. 1995. Effects of glyphosate on nitrogen fixation of free living heterotrophic bacteria. *Letters Application of Microbiology*, 20 (6): 349-352.
- Scott, J. and Carreiro, M. 2000. Nitrifying bacteria in exotic earthworm casts and in rural and urban oak forest soil. Disponible en: <http://abstracts.co.allenpress.com/pweb/esa2000/abstracts/JEA-3-99-118.html>
- Snapp, S. and Borden, H. 2005. Enhanced nitrogen mineralization in mowed or glyphosate treated cover crops compared to direct incorporation. *Plant and Soil*, 270: 101-112.
- Silver, J. and Riley, B. 2001. Environmental Impact of Pesticides Commonly Used on Urban Landscapes. Disponible en: <http://www.pesticide.org/RHSEnvironImpofPs.pdf>
- Solomon, K., Anadón, A., Cerdeira, A. L., Marshall J., Sanín, L. H. 2005. Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos lícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Disponible en: <http://www.cicad.oas.org/ES/glifosatoInformeFinal.pdf>
- Steel, R. G., Torrie, J. H. and Dickey D. A. 1997. *Principles and Procedures of Statistical Biometrical Approach*. Mc Graw-Hill, Inc. New York. Estados Unidos.
- Stratton, G.W. and Stewart, T. K. 1991. Effects of the herbicide glyphosate on nitrogen cycling in an acid forest soil. *Water, Air and Soil Pollution*, 60 (3): 231-248.
- Vargas- De Álvarez, A., Fuentes, C. L. y Torres-Torres, E. 2002. Respuesta al glifosato de un aislamiento de *Rhizoctonia solani*, agente causal del añublo de la vaina de arroz y de cuatro aislamientos de *Trichoderma*, bajo condiciones *in vitro*. *Agronomía colombiana*, 19 (1-2): 43-55.
- Wiersema, R., Burns, M. and Hershberger, D. 2006. Glyphosate Pathway Map. Disponible en: [http://umbbd.ahc.umn.edu/gly/gly\\_map.html](http://umbbd.ahc.umn.edu/gly/gly_map.html)
- Zablutowicz, R. M. and Reddy, K. 2004. Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic. *Journal of Environmental Quality*, 33:825-831

Zobiolo, L.H.S., Oliveira, R.S., Kremer, R.J., Constantim, J., Yamada, T., Castro, C., Oliveira, F.A., Oliveira, A. 2010. Effect of glyphosate on symbiotic N<sub>2</sub> fixation and nickel concentration in glyphosate-resistant soybeans. *Applied Soil Ecology* 44: 176-180