

Efecto del glifosato sobre la producción de aflatoxina B₁ por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas de maíz

Nicolás Benito^{1,3}, Carina E. Magnoli^{1,2}; Carla L. Barberis^{1,2*}

1- Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

2- Miembro de la Carrera de Investigación del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Córdoba, Argentina.

3- Becario de Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FONCYT), Córdoba Argentina.

Palabras Clave

Herbicidas

Micotoxinas

Aspergillus sección *Flavi*

Resumen. El glifosato es el herbicida más utilizado en las prácticas agrícolas regionales en Argentina. Existe información limitada sobre el impacto de este herbicida en la producción de micotoxinas por hongos que comúnmente colonizan los cultivos. El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* el efecto de diferentes concentraciones de glifosato en la producción de aflatoxina B₁ (AFB₁) por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* bajo diferentes condiciones de actividad de agua (α_w) y tiempos de incubación. El medio caldo extracto de levadura, sacarosa (YES) se ajustó a una α_w de 0,99; 0,96 y 0,92, el cual fue modificado con glifosato a una concentración final de 30 y 300 mM (fórmula comercial) y se incubó a 25°C durante 21 días. La producción de aflatoxina B₁ se determinó mediante HPLC a los 7, 14 y 21 días de incubación. Las condiciones óptimas para la acumulación de AFB₁ en los tratamientos de control fueron 0,92 α_w a 21 días de incubación para *Aspergillus flavus* AFM16. La mayor influencia para la producción de AFB₁ fue 30 mM del herbicida para *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 a los 21 días de incubación. Excepto por la cepa AFM 16, todas las cepas mostraron la producción máxima con 30 mM de glifosato a los 21 días de incubación. Estos datos resultan importantes para conocer las consecuencias aflatoxicológicas que implica el uso extensivo del herbicida glifosato en los cultivos extensivos de maíz.

Cita sugerida: Benito, N., *et al.*, 2018. Efecto de glifosato sobre la producción de aflatoxina B₁ por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas de maíz. Revista Científica FAV-UNRC *Ab Intus* 1 (1): 92-105

Recibido: 5 de abril 2018; aceptado: 19 de junio

*Autor para correspondencia: Carla Barberis. E-mail: cbarberis@exa.unrc.edu.ar. Ruta Nac. Nº 36 Km 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Financiamiento: este trabajo fue financiado por Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT-PICT- 0943/14) and Secretaría de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional de Río Cuarto (SECYT-UNRC-18/453).



Effect of glyphosate on aflatoxin B₁ production by *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize.**Keywords**

Herbicide

Mycotoxins

Aspergillus section *Flavi*

ABSTRACT. Glyphosate is the most used herbicide on regional agricultural practices in Argentina. There is limited information about the impact of this herbicide on mycotoxins production of fungal strains that commonly colonize agricultural crops. The objective of this study was evaluate the in vitro effect of different concentrations of glyphosate on aflatoxin B₁ (AFB₁) production by *Aspergillus* section *Flavi* strains under different water activity (a_w) and incubation periods. Yeast Extract, Sucrose medium (YES) was adjusted to 0,99; 0,96 and 0,92 of a_w, and supplied with 30 and 300 mM of glyphosate (commercial formulation) and incubated at 25 °C for 21 days of incubation. AFB₁ was detected by HPLC at 7, 14 and 21 of incubation days. The optimal conditions for the accumulation of AFB₁ in control treatments were 0,92 a_w at 21 days of incubation, for *Aspergillus flavus* AFM16. The highest levels of AFB₁ production was recorder with 30 mM of herbicide for NRRL 2999 at 21 days of incubation. All strains, except AFM 16, showed the maximum levels production with 30 mM of glyphosate at 21 days. These results are important to understand the aflatoxigenic consequences that the extensive use of the herbicide glyphosate may cause on maize crops.

INTRODUCCIÓN

Argentina es uno de los principales países exportadores de maíz (*Zea mays* L.), siendo el área total sembrada en los últimos años 6.900.000 ha (Bolsa de Cereales, 2017). Desde la década de 1990, hubo una transformación significativa en la agricultura del país con la adopción de los cultivos transgénicos, sistemas de siembra directa y el uso de productos químicos para proteger las plantas contra diversas plagas y enfermedades (Pengue, 2005). Uno de los organofosforados habitualmente utilizados en el cultivo de maíz es el herbicida glifosato, técnicamente el N-fosfonometilglicina, (C₃H₈NO₅P) (Lehmann y Pengue, 2000). Es el principio activo de varios herbicidas entre ellos Roundup® (nombre comercial de Monsanto). Es un herbicida sistémico no selectivo, muy utilizado en Argentina y en el resto del mundo para eliminar malezas indeseables en ambientes agrícolas (principalmente en cultivares de soja, maíz, girasol y trigo) y no agrícolas (CASAFE, 2005).

El glifosato es el herbicida que más se está utilizando, según datos estadísticos en el año 2011 se aplicaron más de 650 millones de toneladas (CCM International, 2011). En Argentina, 160.000 toneladas se aplican anualmente para controlar malezas en maíz Glifosato Resistente (GR) (CONICET, 2009). La dosis de aplicación recomendada varía de 2 a 4 L/ha en

sistemas de siembra directa, sin embargo debido a la resistencia de ciertas malezas es habitual la aplicación de dosis más altas o aplicaciones repetidas pre o post- cosecha (Lupwayi *et al.*, 2009). Estudios recientes muestran que existe una gran preocupación en la población acerca de sus riesgos toxicológicos potenciales sobre animales, humanos y el medio ambiente (Antunes *et al.*, 2010; González *et al.*, 2010; Damalas y Eleftherohorinos, 2011, Seralini *et al.*, 2012; Cavalli *et al.*, 2013; Cattani *et al.*, 2014; Coullery *et al.*, 2016). Una alta acumulación de la toxina implica riesgos en la salud humana y animal. Aflatoxina B₁, es el carcinógeno natural más potente conocido. La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC 1993), ha considerado a AFB₁ como carcinógeno humano del Grupo 1. La ingestión de alimentos que contengan estas sustancias durante cierto tiempo puede generar diversos efectos adversos sobre la salud humana; dependiendo de las dosis ingeridas y las condiciones propias de los individuos (Oliveira Rocha *et al.*, 2012).

Peruzzo *et al.*, (2008), evaluaron los niveles de glifosato en muestras de agua, suelo y sedimentos de una zona de cultivo de soja transgénica (Buenos Aires, Argentina). Los niveles de glifosato en los sedimentos y en suelos variaron entre 0,5 y 5,0 mg/kg.

Además se informó en soja residuos de glifosato y aminometilfosfónico (AMPA, principal metabolito de degradación de glifosato) de aproximadamente 100 mg/kg. La normativa vigente aumenta los niveles permitidos de glifosato de 20 a 40 ppm en semillas (EPA, 2017).

A pesar de las aplicaciones de plaguicidas en las grandes áreas de cultivos de maíz existen escasos estudios sobre los efectos en los microorganismos del suelo. Estudios recientes han demostrado que la aplicación de glifosato produce una selección de los microorganismos en el suelo influyendo significativamente sobre su biodiversidad (Santos *et al.*, 2004, 2007; Weaver *et al.*, 2007; Krzysko-Lupicka y Sudol, 2008; Arfarita *et al.*, 2014). Actualmente no existe suficiente información científica sobre el impacto de éste organofosforado en la microbiota del suelo a corto y mediano plazo y en particular sobre los hongos toxicogénicos y su contaminación en el cultivo de maíz. En estudios previos se informó que el suelo constituye la principal fuente de inóculo para *Aspergillus* sección *Flavi* determinando la posterior colonización de los granos de maní, siendo aflatoxina B₁ (AFB₁) la micotoxina más frecuente (Alaniz Zanon *et al.*, 2013). El sur de la Provincia de Córdoba, se encuentra circundado por grandes explotaciones de siembra directa de soja transgénica, maíz y maní; con el consecuente uso de plaguicidas, siendo sin lugar a dudas el glifosato el de mayor aplicación. *A. flavus* produce infecciones que generalmente se localizan en algunos granos de la espiga, cubriéndolo con un micelio de color verde amarillento, que se ubica sobre y entre ellos, con abundante masa de esporas. Si bien los síntomas pueden aparecer como poco perceptibles, estos hongos son importantes por su efecto toxicogénico (Compendium of Corn Diseases, 1999). Las aflatoxinas (AFs) son las micotoxinas más peligrosas y se consideran contaminantes inevitables de los alimentos, dado que no pueden prevenirse ni eliminarse totalmente de las materias primas con las prácticas agrícolas actuales (Zain, 2011).

En estudios recientes se realizó el aislamiento de la microbiota cultivable presente en suelos destinados al cultivo de maíz con más de diez años de exposición a glifosato. Se determinó que las especies de las secciones *Flavi* y *Nigri* son las más frecuentes (Carranza *et al.*, 2014). Se evaluó además el efecto *in vitro* del glifosato sobre el crecimiento de especies

de la sección *Flavi* (Barberis *et al.*, 2013). Considerando que los propágulos fúngicos presentes en el suelo y en los cultivos están expuestos a la contaminación con compuestos organofosforados, en este caso glifosato, en este trabajo se planteó evaluar de manera *in vitro* el efecto de diferentes dosis de este plaguicida sobre la producción de AFB₁ por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas de granos de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Se seleccionaron tres cepas de *Aspergillus flavus* aisladas de granos de maíz para ser evaluadas en los ensayos toxicogénicos. Las cepas de maíz seleccionadas (*A. flavus* AFM16, AFM78, AFM79) y una cepa de referencia (*A. parasiticus* 2999) fueron aquellas con los niveles más altos de producción de AFB₁ en agar extracto de malta (MEA). Las cepas se conservaron en glicerol al 15% (Sigma-Aldrich) (Benito *et al.*, 2017).

Medios de cultivo utilizados

Se prepararon Erlenmeyers conteniendo 50 mL de medio de cultivo Caldo Extracto de Levadura, Sacarosa (YES). Las a_w de los diferentes medios fueron ajustadas a 0,99, 0,96, y 0,92 con el agregado de volúmenes conocidos del soluto no iónico glicerol (Dallyn y Fox, 1980). La a_w de todos los medios fue confirmada mediante el uso de un equipo Aqualab Series 3 (Decagon devices; INC., WA., USA). Posterior al proceso de esterilización por autoclave se adicionaron al medio de cultivo los volúmenes correspondientes a las concentraciones de glifosato utilizadas. Se utilizó glifosato formulado comercial (Roundup Controlmax® Monsanto), a partir del cual se preparó una solución madre de concentración 2 M. Se pesaron 23,48 g del herbicida (cantidad de principio activo: 720 g/Kg) y se disolvieron en 50 mL de agua destilada. A partir de allí se prepararon soluciones de trabajo para obtener las concentraciones de 0 mM (Controles), 30 mM y 300 mM de glifosato.

Inoculación e incubación

Cada cepa se desarrolló individualmente en placas conteniendo MEA durante 7 días a 25°C. Posteriormente cada Erlenmeyer fue inoculado con 100 μ L de una suspensión de conidios de aproximada-

mente 10^5 conidios/ mL de cada cepa, los mismos fueron incubados en oscuridad a 25 °C durante 21 días. Cada tratamiento se realizó por triplicado y el ensayo en su totalidad fue realizado duplicado. A los 7, 14 y 21 días de incubación, se extrajo 1 mL de medio de cultivo de cada uno de los tratamientos y se los colocó en microtubos para la posterior extracción y detección de AFB₁.

Extracción de AFB₁ del medio de cultivo

La extracción de AFB₁ se realizó siguiendo la metodología descrita por Geisen (1996) con modificaciones, se adicionó 1 mL de cloroformo a cada uno de los microtubos agitando vigorosamente durante 1 minuto. Luego se tomó la fase clorofórmica y se evaporó a sequedad hasta su procesamiento.

Detección y Cuantificación de AFB₁

La cuantificación de AFB₁ se realizó por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) siguiendo la metodología propuesta por Trucksess *et al.*, (1994). Los extractos clorofórmicos secos se resuspendieron en 200 µL de metanol y se derivatizaron con 700 µL

de una mezcla de ácido trifluoroacético/ácido acético/agua (20:10:70 v/v/v). Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna de fase inversa C18 de acero inoxidable (150 x 4,6 mm i.d., 5 mm de tamaño de partícula) (Luna-Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.). El sistema de HPLC consistió en un cromatógrafo Waters Alliance e2695 Separations Module, equipado con inyector automático, acoplado a un detector de fluorescencia Waters 2475 Multi λ Fluorescence Detector. Las longitudes de onda de emisión y excitación usadas fueron 360 y 430 nm, respectivamente. La fase móvil utilizada consistió en una mezcla isocrática de acetonitrilo:metanol:agua (17:17:64 v/v/v) con un flujo de 1.5 mL/min. Se construyeron curvas de calibración con las soluciones testigo de diferentes concentraciones de AFB₁. La toxina se cuantificó por correlación entre el área de los picos cromatográficos de las muestras y las curvas estándares (Figura 1). Se determinó la concentración de AFB₁ producida por mL de medio de cultivo. El límite de detección del método analítico fue de 0.7 ng/mL.

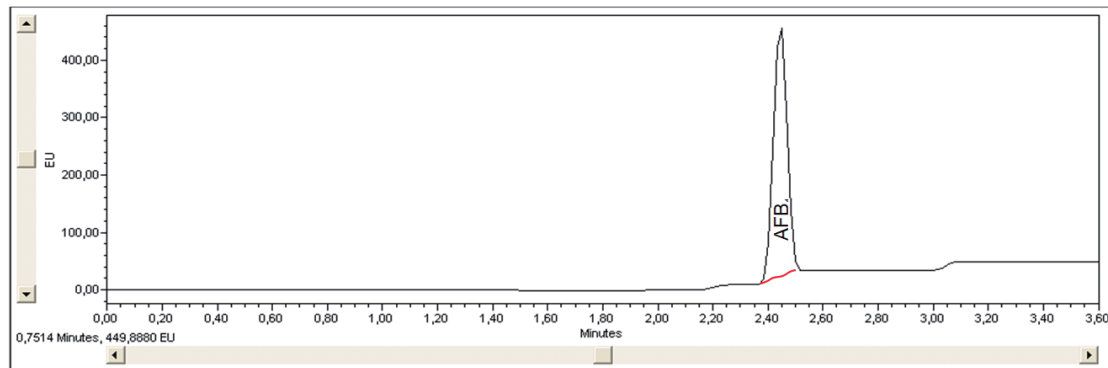


Figura 1. Cromatograma correspondiente a la cepa AFM 78, inoculada en medio de cultivo YES adicionado con 30 mM de glifosato comercial y 7 días de incubación; el mismo muestra el pico correspondiente a la producción de AFB₁.

Análisis estadístico

Se determinó la normalidad y homogeneidad de la varianza de los datos obtenidos de producción de AFB₁ (ng/mL) a las diferentes condiciones evaluadas para realizar el estudio estadístico. Los mismos fueron sometidos a un análisis de varianza para obtener el efecto de cada uno de los factores sobre la variable a analizar.

RESULTADOS

El análisis de varianza indicó que los factores a_w , concentración de glifosato y días de incubación, influenciaron significativamente la producción de AFB₁ para las 4 cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*, excepto la variable días de incubación para la cepa AFM 78. Por otro lado, el factor cepa no influyó significativamente.

Fuente de variación	gl [†]	0,99		0,96		0,92		
		a _w						
		CM [‡]	F [§]	CM [‡]	F [§]	CM [‡]	F [§]	
AFM 16	T	2	15906868,77	27320957,88*	31402926,97	52728795,16*	21020629,52	43391207,95*
	G	2	23075232,82	39633033,57*	29222980,94	49068438,02*	39597230,63	81737403,10*
	T x G	4	15906868,77	21026945,71*	23132159,98	38841313,30*	17382022,75	35880322,38*
AFM 78	T	2	3399818,86	5099728,29*	371,72	759,03*	6,43	12,43
	G	2	2875692,31	4313538,47*	308,23	629,39*	9,38	18,14*
	T x G	4	2939853,55	4409780,32*	556,99	1137,36*	3,65	7,07
AFM 79	T	2	3369,08	4859,25*	415,61	713,84*	14111607,68	17837706,33*
	G	2	10912,69	15739,45*	849,41	1458,91*	4299161,75	5434333,67*
	T x G	4	3022,49	4359,36*	858,12	1473,86*	4602370,87	5817603,62*

*Valores estadísticamente significativos (p < 0.0001).

Tabla 1. Análisis de la varianza del efecto de la concentración de glifosato (G) y diferentes días de incubación (T), y sus interacciones sobre la producción de AFB₁ de cepas de *A. sección Flavi* sobre medio YES.

Las Figuras N° 2 y 3 muestran la producción de AFB₁ (ng/mL) de cuatro cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* (AFM 16, AFM 78, AFM 79 y NRRL 2999), durante 21 días en medio de cultivo adicionado con diferentes concentraciones de glifosato y a tres distintas a_w. En general, en los tratamientos controles se observó que, los niveles máximos de producción de AFB₁, se produjeron a 0,92 de a_w. En cuanto al tiempo de incubación, los máximos niveles fueron observados a los 14 y 21 días de incubación según la cepa analizada, el máximo alcanzado fue de alrededor de 8400 ng/mL, a los 21 días para la cepa AFM16.

En los tratamientos adicionados con diferentes concentraciones de glifosato (30 y 300 mM) se observó que las cepas, no se comportaron de manera uni-

forme con respecto a la producción de AFB₁ en el medio de cultivo. En algunos tratamientos se observó que las mismas, independientemente de la a_w ensayada, mostraron un aumento en la producción de AFB₁ con respecto a los tratamientos controles. Cuando las mismas crecieron con 30 mM del herbicida, principalmente a los 14 y 21 días de incubación, por ejemplo, la cepa AFM 16 aumentó su capacidad toxicogénica 800 veces cuando se incubó a 0,96 de a_w durante 14 días (Figura 2B) (p < 0,05). Los tratamientos con 300 mM de glifosato resultaron inhibitorios para la producción de AFB₁ en algunas cepas, el máximo nivel de producción se observó en la cepa AFM 79 a los 21 días de incubación y 0,92 de a_w (2362 ng/mL) (Figura 3B).

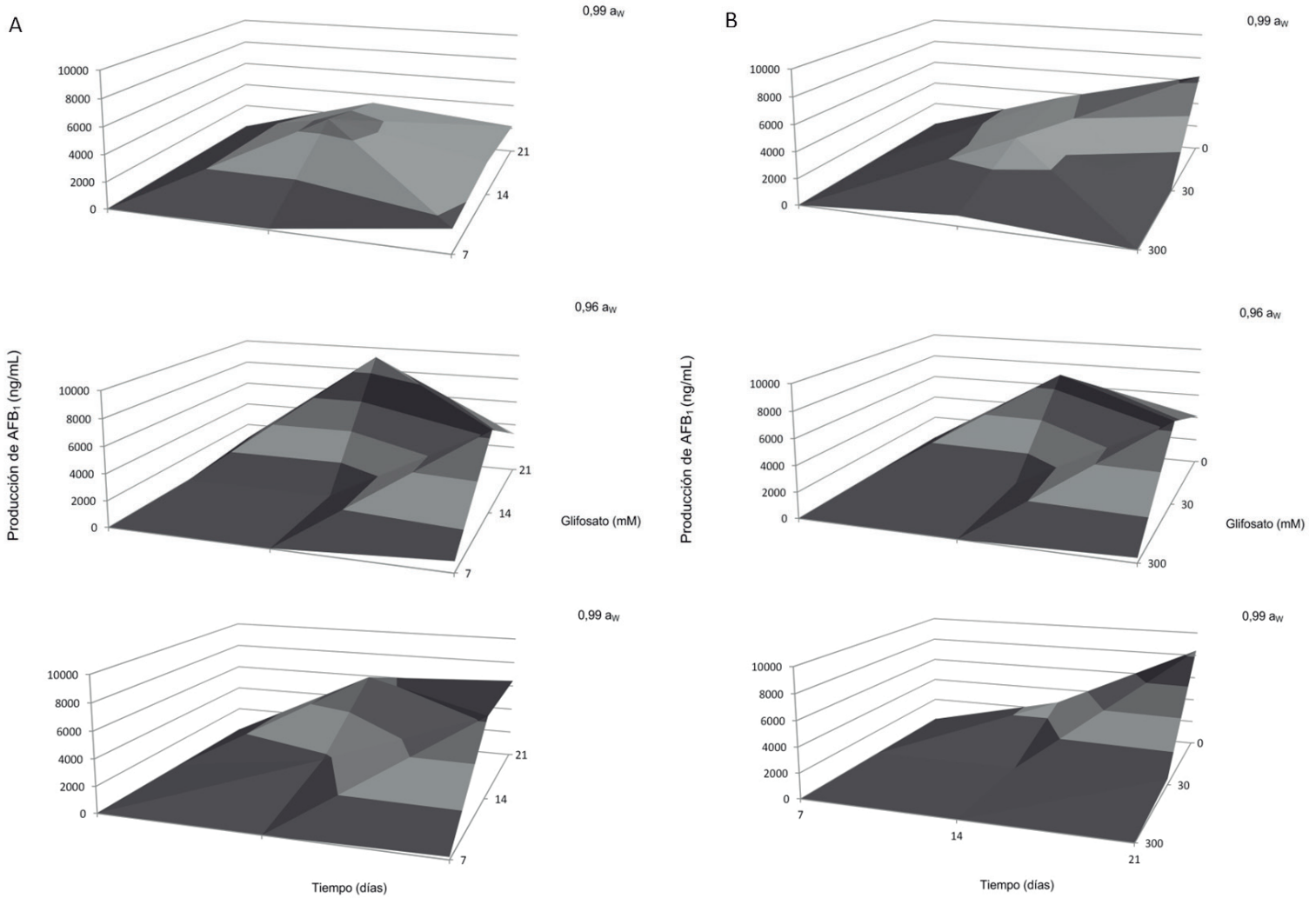


Figura 2. Efecto de glifosato sobre la producción de AFB₁ por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*: (A) NRRL 2999; (B) AFM 16 bajo diferentes condiciones de a_w . Límite de detección: 0,7 ng/ mL (ppb). Los diferentes tonos de grises describen el aumento en la producción de AFB₁ detectada en el medio de cultivo.

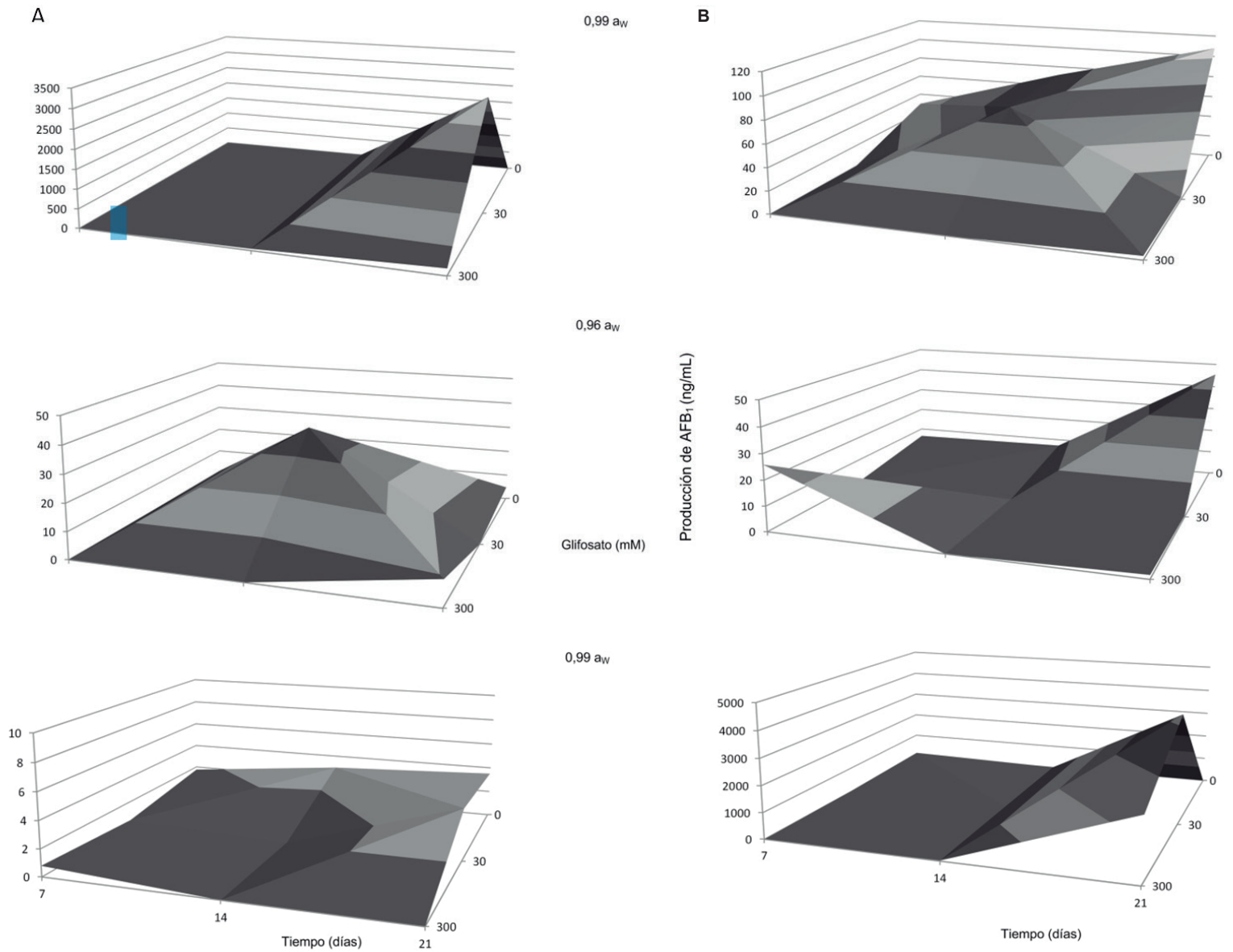


Figura 3. Efecto de glifosato sobre la producción de AFB₁ por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*: (A) AFM 78; (B) AFM 79 bajo diferentes condiciones de a_w . Límite de detección: 0,7 ng/mL (ppb). Los diferentes tonos de grises describen el aumento en la producción de AFB₁ detectada en el medio de cultivo.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó de manera *in vitro* el efecto de diferentes dosis de glifosato sobre la producción de AFB₁ por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas de granos de maíz. En Argentina algunos investigadores estudiaron los niveles de glifosato y AMPA tanto en suelo como en aguas superficiales en zonas agrícolas de la provincia de Buenos Aires. Peruzzo *et al.*, (2008) informaron valores de glifosato en agua superficial cercana a campos cultivados del norte de la provincia de Buenos Aires entre 0,1 y 0,7 mg/L, mientras que en los sedimentos y en el suelo los niveles de este herbicida variaron entre 0,5 y 5 mg/Kg. Estos autores observaron una variación temporal en los niveles de glifosato detectados debidas directamente al momento de aplicación del herbicida y a las precipitaciones. En otro trabajo, Aparicio *et al.*, (2013) detectaron niveles entre 35 y 1502 µg/Kg de glifosato y valores entre 299 y 2256 µg/Kg de AMPA en suelos cultivados. Estos autores analizaron además muestras de agua superficial, partículas en suspensión y sedimento. Los niveles de glifosato y AMPA encontrados en estas muestras fueron menores con respecto a los detectados en suelo. En un trabajo más reciente, Lupi *et al.*, (2015) también analizaron niveles de glifosato y AMPA en suelo, agua y sedimento. Estos autores informaron niveles de glifosato en suelo previos a la aplicación del herbicida entre 0,1 y 0,2 µg/g, mientras que luego de la aplicación del mismo estos niveles se incrementaron. Además observaron que tanto las concentraciones de glifosato como de AMPA fueron menores en aquellas muestras tomadas a mayor profundidad del suelo. En cuanto a los sedimentos, estos autores informaron niveles de herbicida menores con respecto al suelo (0,0053 a 0,0263 µg/g); mientras que en aguas superficiales se detectó en mayor medida AMPA siendo los valores detectados de hasta 0,5 ng/mL. Actualmente no existen datos sobre los niveles de glifosato residual en granos de maíz de la provincia de Córdoba.

Cuando se evaluaron los efectos producidos por glifosato sobre la producción de AFB₁ se observó que en general a altas concentraciones de este herbicida, la producción de AFB₁ se observó inhibida para la mayoría de las cepas analizadas; sólo en algunos

casos se pudo registrar producción de toxina, pero con valores relativamente bajos. Las condiciones a las cuales la producción de la toxina se ve significativamente estimulada fueron los tratamientos con la adición de 30 mM del herbicida, este hecho se observó independientemente de las actividades acuosas ensayadas y en las cuatro cepas. Barberis *et al.*, (2013) al evaluar la producción de AFB₁ por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* en presencia de glifosato encontraron que existió una estimulación en la producción de toxina en concentraciones entre 1.5 y 5 mM a 0,95 de a_w. Los resultados de este estudio no concuerdan con los de estos autores debido a que se registró una estimulación de toxina sólo en los tratamientos controles y en todos los niveles de actividad acuosa ensayadas. Otro estudio similar fue realizado por Reddy *et al.*, (2007), quienes estudiaron la incidencia de aflatoxinas en maíz y algodón; y la resistencia al plaguicida de las cepas de *A. flavus* aisladas. Estos autores observaron que a medida que la concentración del herbicida aumentaba (5 y 10 mM) la producción de toxinas disminuía. Este comportamiento informado concuerda con los observados en este estudio. También Reddy *et al.*, (2009) evaluaron la influencia de carbadazima y triciclazol sobre la producción de AFB₁ por *A. flavus*, observando que este parámetro disminuía conforme aumentaban las concentraciones de ambos fungicidas. La inhibición total de la producción de toxina se registró a la concentración más baja estudiada (5 mM) para carbadazima, mientras que para triciclazol la inhibición fue a 20 mM. Estos resultados sugieren que la determinación de dosis óptimas de plaguicidas aplicados sobre un sustrato natural es de gran importancia. Altos niveles de los mismos no aseguran la inhibición en la producción de toxina, e implican la posibilidad de producir efectos indeseables en las características organolépticas del grano y un riesgo por la presencia de residuos de estos compuestos en los granos. Por otro lado, se ha estudiado que dosis muy bajas de éstos y una inadecuada distribución causarían un incremento en la esporulación, velocidad de crecimiento y producción de metabolitos secundarios. Al analizarse los resultados obtenidos en los ensayos con glifosato se observó que este plaguicida afecta negativamente el crecimiento y pro-

ducción de toxinas del hongo en estudio en todas las condiciones, tanto en los ensayos *in vitro* como *in situ*, a medida que las concentraciones utilizadas iban en aumento tanto el crecimiento fúngico y la producción de toxinas disminuían.

Finalmente, estos resultados indican que la presencia del herbicida glifosato afecta la producción de aflatoxinas por cepas de *A. flavus*, constituyendo un factor más de riesgo si estas especies están expuestas a estos compuestos organofosforados en los sistemas productivos. Estos tipos de ensayos ecofisiológicos son muy importantes debido a que permiten conocer a qué condiciones el hongo es capaz de desarrollarse y producir sus micotoxinas y a qué condiciones no. Una vez conocidas las condiciones a las cuales el hongo se desarrolla y produce sus micotoxinas sobre el grano de maíz, junto con la implementación de buenas prácticas agrícolas y de almacenamiento, es posible crear estrategias futuras para evitar el desarrollo de este hongo y su posterior producción de AFB₁ en el campo y de esta manera evitar pérdidas en las características organolépticas del grano, en los rendimientos económicos y riegos en la salud del hombre y animales.

BIBLIOGRAFÍA

Alaniz Zanon, M.S.; Chiotta, M.L.; Gaj-Merlera, G.; Barros, G.; Chulze, S. 2013. Evaluation of potential biocontrol agent for aflatoxin in Argentinean peanuts. *International Journal of Food Microbiology*. 162: 220-223.

Antunes, S.; Pereira, J.; Cachada, A.; Duarte, A.; Gonçalves, F.; Sousa, J.; Pereira R. 2010. Structural effects of the bioavailable fraction of pesticides in soil: Suitability of elutriate testing. *Journal of Hazardous Materials*. 84: 215–225.

Aparicio, V.C.; De Gerónimo, E.; Marino, D.; Primost, J.; Carriquiriborde, P.; Costa, J.L. 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere*. 93: 1866-1873.

Arfarita, N.; Imai, T.; Prasetya, B. 2014. Potential use of soil-born fungi isolated from treated soil in Indo-

nesia to degrade glyphosate herbicide. *Journal of Degraded and Mining Lands Management*. 1: 63-68.

Barberis, C. L.; Carranza, C. S.; Chiacchiera, S. M.; Magnoli, C. E. 2013. Influence of herbicide glyphosate on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from soil on *in vitro* assay. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 48: 1070-1079.

Benito, N.; Carranza, C.S.; Aluffi, M.E.; Magnoli, K.; Regñicoli, J.P.; Magnoli, C.E.; Barberis, C.L. Evaluación de la producción de Aflatoxina B1 por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas de campos maiceros de Argentina. En Libro de Resúmenes del IX Congreso Latinoamericano de Micología. Agosto de 2017. Lima: Perú.

Bolsa de Cereales de Rosario. 2017. *Bulletin of Science, Technology & Society*. 25: 314-322. [en línea] [Citado Noviembre 2017] Disponible en: <http://www.bcr.com.ar/Pages/Publicaciones/anuario.aspx>.

Carranza, C.S.; Bergesio, M.V.; Barberis, C.L.; Chiacchiera, S.M.; Magnoli, C.E. 2014. Survey of *Aspergillus* section *Flavi* presence in agricultural soils and effect of glyphosate on nontoxigenic *A. flavus* growth on soil-based medium. *Journal of Applied Microbiology*. 116: 1229-1240.

CASAFE (Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes). 2005. Evolución del mercado fitosanitario argentino. Bs. As. Argentina. [en línea] [Citado Febrero de 2018]. Disponible en: <http://www.casafe.org.ar/m2005.htm>.

Cattani, D.; Cavalli, V. L.; Heinz Rieg, C. E.; Domingues, J. T.; Dal-Cim, T.; Tasca, C. I.; Barreto Silva, F. R. M.; Zamoner, A. 2014. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology*. 320: 34-45.

Cavalli, V. L.; Cattani, D.; Heinz Rieg, C. E.; Pierozan, P.; Zanatta, L.; Parisotto Benedetti, E.; Wilhelm, D.; Barreto Silva, F. R. M.; Pessoa-Pureur, R.; Zamoner, A. 2013. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 65: 335–346.

- CCM International. Outlook for China glyphosate Industry. 2011.
- Compendium of Corn Diseases. 1999. Editor: Donald G. White. Third Edition. APS P. St Paul, USA, 78p.
- CONICET. (Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas). 2009. Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos decreto 21/2009. Evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. [en línea] [Citado Noviembre 2017] Disponible en: <http://www.msal.gob.ar/agroquimicos/pdf/INFORME-GLIFOSATO-2009-CONICET.pdf>.
- Coullery, R.; Ferrari, M.; Bosso, S. 2016. Neuronal development and axon growth are altered by glyphosate through a WNT non-canonical signaling pathway. *NeuroToxicology*. 52: 150–161.
- Dallyn, H.; Fox, A. 1980. Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. En *Microbial Growth and Survival in Extreme Environments*; Gould, G.H., Corry, J.E.L., Eds.; Academic Press: London, New York, 129-139
- Damalas, C.A.; Eleftherohorinos I.G. 2011. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8: 1402-1419.
- De Oliveira Rocha, L.; Reis, G.M.; Braghini, R.; Kobasigawa, E.; de Araújo, J.; Correa, B. 2012. Characterization of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*. 132: 353-366.
- EPA. (Agencia de protección ambiental de Estados Unidos). 2017. Infórmese: plaguicidas. [en línea] [Citado Febrero 2018]. Disponible en: <https://espanol.epa.gov/>.
- Geisen, R. 1996. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Systematic and Applied Microbiology*. 19: 388-392.
- Gonzalez, M.; Miglioranza, K.; Aizpún, J.; Isla, F.; Peña, A. 2010. Virulence and enzymatic activity of three new isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) from the South American locust *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae). *Chemosphere*. 81:351-358.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1993. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk for Humans. Lyon: IARC. 56: 257-263.
- Krzysko-Lupicka ; Sudol T. 2008. Interactions between glyphosate and autochthonous soil fungi surviving in aqueous solution of glyphosate. *Chemosphere*. 71:1386-1391.
- Lehmann, V.; Pengue, W. A. 2000. Herbicide tolerant soybean: just another step in a technology treadmill?. *Biotechnology and Development Monitor*. 43: 11-14.
- Lupi, L.; Miglioranza, K.S.B.; Aparicio, V.C.; Marino, D.; Bedmar, F.; Wunderlin, D.A. 2015. Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Science of the Total Environment*. 536: 687-694.
- Lupwayi, N.Z.; Harker, K.N.; Clayton, G.W.; O'Donovan, J.T., Blackshaw, R.E. 2009. Soil microbial response to herbicides applied to glyphosate-resistant canola. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 129, 171–176.
- Pengue W.A. 2005. Transgenic Crops in Argentina: The Ecological and Social Debt. *Bulletin of Science, Technology & Society* 25 4: 314-322.
- Peruzzo, P. J.; Porta, A. A.; Ronco, A. E. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*. 156: 61-66.
- Reddy, K.N.; Abbas, H.K.; Zablotowicz, R.M.; Abel, C.A.; Koger C.H. 2007. Mycotoxin occurrence and *Aspergillus flavus* soil propagules in a corn and cotton glyphosate-resistant cropping systems. *Food Additives & Contaminants*. 24: 1367-1373.
- Reddy, K.R.N.; Reddy, C.S.; Muralidharan, K. 2009. Efficacy of certain agrochemicals on *Aspergillus* spp. and subsequent aflatoxin production in rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 93: 53-57.

Santos, J. B. 2004. Efeitos de diferentes formulações comerciais de glyphosate sobre estirpes de *Bradyrhizobium*. *Planta Daninha*. 32: 293-299.

Santos, J. B. 2007. Efeito de formulações na absorção e translocação do glyphosate em soja transgênica. *Planta Daninha*, 2: 381-388.

Séralini, G.E.; Clair, E.; Mesnage, R.; Gress, S.; Defarge, N.; Malatesta, M.; Hennequin, D.; Spiroux de Vendômois, J. 2012. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food and Chemical Toxicology*. 50: 4221-4231.

Trucksess, M.W.; Stack, M.E.; Nesheim, S.; Albert, R.; Romer, T. 1994. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts: collaborative study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 77: 1512-1521.

Weaver, M.A.; Jason Krutz, L.; Zablotowicz, R.M.; Reddy, K.N. 2007. Effects of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Mississippi soil. *Pest Management Science* 63: 388-393.

Zain, M.E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. 15: 129-144.