

# **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

## **SEDE QUITO**

### **CARRERA:**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

### **Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:**

**INGENIEROS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

### **TEMA:**

**ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN**

**DE GLIFOSATO A PARTIR DE MICROORGANISMOS**

**AISLADOS DEL SUELO**

### **AUTORES:**

**MARÍA BELÉN MONTALUISA ÁLVAREZ**

**ESTEBAN ANDRÉS ROJAS CHÁVEZ**

### **TUTOR:**

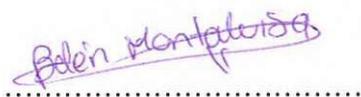
**MARÍA ELENA MALDONADO RODRÍGUEZ**

Quito, julio 2019

### Cesión de derechos de autor

Nosotros, María Belén Montaluisa Álvarez, con documento de identificación N°1721763561 y, Esteban Andrés Rojas Chávez, con documento de identificación N° 1719150433, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “Análisis de la capacidad de biodegradación de glifosato a partir de microorganismos aislados del suelo”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de Ingenieros en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado por la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores, nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

  
.....

María Belén Montaluisa Álvarez

C.I.: 1721763561

  
.....

Esteban Andrés Rojas Chávez

C.I.: 1719150433

### **Declaratoria de coautoría del docente tutor**

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación **“ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE GLIFOSATO A PARTIR DE MICROORGANISMOS AISLADOS DEL SUELO”**, realizado por estudiantes María Belén Montaluisa Álvarez CI: 1721763561 y Esteban Andrés Rojas Chávez CI: 1719150433, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, julio del 2019



María Elena Maldonado R.

C.I. 1707743157

## **Dedicatoria**

A mi madre, Catalina Álvarez, por su amor y su apoyo incondicional, por ser un pilar fundamental de mi vida y quien me ha enseñado a formar mi carácter. A mi padre, Luis Montaluisa por enseñarme que de los errores también se aprende; a mi hermano David, por todas las enseñanzas y risas que hemos compartido y ser mi fiel compañero de aventuras. A Mauricio por todo el amor, comprensión y ternura. A mi abuelito Julio, por enseñarme a amar la naturaleza y la pintura. A Esteban Rojas, por todos los momentos y las comidas compartidas a lo largo de nuestra carrera universitaria.

### **Belén Montaluisa**

A mi madre, Martha Chávez, quien, con su amor, dedicación y apoyo incondicional, me ha guiado en cada etapa de mi vida. A mi padre, Galo Rojas, por sus enseñanzas sobre la persistencia, el esfuerzo y la excelencia para alcanzar cualquier meta planteada. A mis hermanos, Gabriela Cárdenas, Andrea Rojas y Joshua Rojas, por ser fuente de inspiración para nunca rendirme ante las adversidades. A mis sobrinos, en quienes encuentro paz y felicidad, siendo un motivo más por el cual superarme a cada instante. A mi amiga y compañera de tesis, Belén Montaluisa, por su comprensión, determinación y cariño, siendo una persona de la cual he aprendido mucho. Finalmente, a mis amigos, por formar parte de toda mi carrera universitaria, alegrar cada día de mi vida y, sobre todo, por su amistad y lealtad.

### **Esteban Rojas**

## **Agradecimiento**

A la Universidad Politécnica Salesiana y a los docentes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de los RR.NN. por todas las enseñanzas necesarias para concluir con nuestra formación académica, dándonos pautas esenciales para el desarrollo profesional y personal.

A nuestra tutora de tesis, PhD. María Elena Maldonado por la oportunidad de realizar el presente proyecto en el grupo de investigación BIOARN.

A los docentes PhD. Paco Noriega y MSc. Laura Huachi, por brindarnos ayuda con sus valiosos conocimientos y sabios consejos en la interpretación de los resultados obtenidos durante la investigación.

A los ayudantes del Laboratorio de Ciencias de la Vida, Ing. Byron Fuertes e Ing. Johanna Meneses, por sus consejos y apoyo incondicional en cada etapa del desarrollo experimental de nuestro trabajo de titulación.

Finalmente, a nuestros amigos Humptumps, Adriana Mogrovejo, Johanna Andrade, Larissa Jaramillo, Vanessa Garzón, Byron Fuertes, Pamela Logroño, Johana Lozano, Diana Paucar, Gina Jami, Lisbeth Molina y Diego Guzmán, por ser parte de nuestra etapa universitaria y de nuestras vidas, brindándonos su amistad, cariño y lealtad en cada momento.

## Índice de contenido

Introducción .....	1
1. Marco Teórico.....	4
1.1. Microorganismos.....	4
1.1.1. Microorganismos presentes en el suelo.....	4
1.2. Aislamiento de microorganismos .....	5
1.3. Caracterización de microorganismos .....	6
1.3.1. Tinción Gram .....	6
1.3.2. Tinción de esporas.....	6
1.3.3. Pruebas bioquímicas.....	7
1.3.4. Catalasa .....	8
1.3.5. Oxidasa.....	8
1.3.6. Indol .....	8
1.3.7. Sistemas miniaturizados API (Analytical Profile Index).....	9
1.4. Glifosato .....	10
1.4.1. Descripción .....	10
1.4.2. Usos.....	11
1.4.3. Efectos.....	12
1.4.4. Suelo.....	12
1.4.5. Agua .....	13
1.4.6. Vegetales .....	14
1.4.7. Salud.....	14
1.4.8. Microorganismos .....	15
1.5. Biorremediación .....	15
1.5.1. Mecanismos de degradación de glifosato mediante microorganismos	16

1.5.1.1.	Ruta C-P liasa y sarcosina de degradación de glifosato .....	16
1.5.1.2.	Ruta AMPA y glioxilato de metabolismo de glifosato .....	18
1.6.	Técnicas analíticas para la determinación de la biodegradación de glifosato .....	19
1.6.1.	Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis).....	19
1.6.2.	Determinación de la sensibilidad mediante microdilución en caldo....	20
1.6.3.	Cromatografía .....	21
1.6.3.1.	Cromatografía en capa fina .....	21
1.6.3.2.	Revelado de la placa.....	22
1.6.3.3.	Determinación del factor de retención (Rf).....	23
2.	Materiales y métodos .....	24
2.1.	Recolección de muestras .....	24
2.2.	Aislamiento de microorganismos de suelo con capacidad biodegradadora de glifosato .....	24
2.2.1.	Siembra en medio con glifosato.....	24
2.2.2.	Siembra de diluciones .....	25
2.2.3.	Conservación de las cepas aisladas .....	25
2.3.	Caracterización de microorganismos con capacidad biodegradadora de glifosato .....	25
2.3.1.	Tinción Gram .....	26
2.3.2.	Tinción de esporas.....	26
2.3.3.	Prueba de oxidasa.....	26
2.3.4.	Prueba de catalasa .....	27
2.3.5.	Prueba indol .....	27
2.3.6.	Pre-selección de microorganismos tolerantes a glifosato .....	27

2.4.	Identificación bioquímica de cepas tolerantes a glifosato.....	27
2.5.	Determinación de la tolerancia de los microorganismos a glifosato mediante microdilución en caldo .....	28
2.5.1.	Preparación de inóculos bacterianos .....	28
2.5.2.	Determinación de la tolerancia a glifosato mediante microdilución en caldo .....	29
2.5.3.	Adición del colorante cloruro de trifeniltetrazolio (TTC).....	31
2.5.4.	Lectura de placas multipocillo .....	31
2.5.5.	Determinación del Log UFC/mL mediante curva de calibración .....	31
2.5.6.	Análisis estadístico.....	33
2.6.	Análisis de la capacidad biodegradadora de glifosato mediante técnicas cromatográficas .....	34
2.6.1.	Selección de la fase móvil.....	34
2.6.2.	Preparación de la muestra .....	34
2.6.3.	Lectura cromatográfica .....	35
3.	Resultados y discusión.....	36
3.1.	Recolección de muestras .....	36
3.2.	Aislamiento y caracterización de microorganismos de suelo con capacidad biodegradadora de glifosato .....	36
3.3.	Pre-selección de microorganismos tolerantes a glifosato.....	39
3.4.	Identificación bioquímica de cepas tolerantes a glifosato.....	40
3.5.	Determinación de la tolerancia de los microorganismos a glifosato mediante microdilución en caldo .....	41
3.5.1.	Evaluación cualitativa .....	41
3.5.2.	Evaluación cuantitativa mediante análisis estadístico.....	42

3.5.2.1. Tolerancia de la cepa PG54P01 a glifosato, mediante prueba Duncan 5 % .....	43
3.5.2.2. Tolerancia de la cepa <i>Burkholderia cepacia</i> PG54P04 a glifosato, mediante prueba Duncan 5 % .....	44
3.5.2.3. Tolerancia de la cepa <i>Escherichia coli</i> PG54T04 a glifosato, mediante prueba Duncan 5 % .....	46
3.5.2.4. Comparación entre la tolerancia de las cepas PG54P01, <i>Burkholderia cepacia</i> PG54P04 y <i>Escherichia coli</i> PG54T04 .....	47
3.6. Análisis de la capacidad biodegradadora de glifosato mediante cromatografía en capa fina (TLC) .....	49
Conclusiones .....	53
Recomendaciones.....	55
Referencias.....	56
Anexos .....	64

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Diseño de la placa de multipocillos con las concentraciones ( % (v/v)) de glifosato utilizadas .....	30
<b>Tabla 2.</b> Relación entre 5 puntos de escala McFarland y UFC/mL .....	32
<b>Tabla 3.</b> Diseño experimental para el análisis factorial de la UFC/mL .....	33
<b>Tabla 4.</b> Caracterización macroscópica de los microorganismos degradadores de glifosato .....	37
<b>Tabla 5.</b> Caracterización microscópica de los microorganismos biodegradadores de glifosato .....	38
<b>Tabla 6.</b> Lectura de Log UFC/mL obtenida a partir de la ecuación de la recta de cada cepa .....	43
<b>Tabla 7.</b> Análisis cromatográfico de la biodegradación de glifosato a los 5 días de inoculación bacteriana .....	49
<b>Tabla 8.</b> Análisis cromatográfico de la biodegradación de glifosato a los 15 días de inoculación bacteriana .....	50

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Molécula de glifosato con grupos funcionales fosfato, amino y carbonilo	10
<b>Figura 2.</b> Ruta de degradación de glifosato mediante C-P liasa, formación de sarcosina y otros metabolitos.....	17
<b>Figura 3. a)</b> Ruta AMPA y glioxilato de metabolismo de glifosato, <b>b)</b> ruta alternativa "fosfonatasa" .....	19
<b>Figura 4.</b> Niveles de absorbancia a 625 nm para cada cepa bacteriana aislada a partir de muestras de suelo e incubadas por 24 horas .....	39
<b>Figura 5.</b> Tolerancia medida en Log UFC/mL de la cepa PG54P01 a distintas concentraciones de glifosato .....	44
<b>Figura 6.</b> Tolerancia medida en Log UFC/mL de la cepa <i>Burkholderia cepacia</i> PG54P04 a distintas concentraciones de glifosato .....	45
<b>Figura 7.</b> Tolerancia medida en Log UFC/mL de la cepa <i>Escherichia coli</i> PG54T04 a distintas concentraciones de glifosato.....	47
<b>Figura 8.</b> Comparación entre la tolerancia Log UFC/mL de las tres cepas aisladas.	48

## Índice de Anexos

<b>Anexo 1.</b> PG54P01 y <i>Burkholderia cepacia</i> PG54P04 inoculadas en distintos medios selectivos.....	64
<b>Anexo 2.</b> Tinción Gram de las cepas PG54P01, <i>Burkholderia cepacia</i> PG54P04 y <i>Escherichia coli</i> PG54T04.....	65
<b>Anexo 3.</b> Prueba para identificación bioquímica (API) de las cepas <i>Burkholderia cepacia</i> PG54P04 y <i>Escherichia coli</i> PG54T04.....	66
<b>Anexo 4.</b> Identificación bioquímica de <i>Burkholderia cepacia</i> PG54P04, mediante el software CrystalMind .....	67
<b>Anexo 5.</b> Identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i> PG54T04, mediante el software CrystalMind .....	68
<b>Anexo 6.</b> Resultado de la identificación bioquímica de la cepa PG54P01, mediante el software CrystalMind .....	69
<b>Anexo 7.</b> Curva de calibración de PG54P01, <i>Burkholderia cepacia</i> PG54P04 y <i>Escherichia coli</i> PG54T04.....	70
<b>Anexo 8.</b> Determinación de la tolerancia a glifosato mediante microdilución en caldo .....	71
<b>Anexo 9.</b> Cromatografía TLC de la biodegradación en 5 días por las cepas PG54P01, PG54P04 y PG54T04 vistas bajo luz UV a 254 nm, 356 nm y con revelador de ninhidrina.....	72

<b>Anexo 10.</b> Cromatografía TLC de la biodegradación a los 15 días por las cepas PG54P01, PG54P04 y PG54T04 vistas bajo luz UV a 254 nm, 365 nm y con revelador de ninhidrina .....	73
--	----

## Resumen

En la presente investigación se analizó la capacidad de biodegradación de glifosato a partir de microorganismos aislados de suelo contaminado con el herbicida. Para ello, se aislaron y caracterizaron, tanto macro- como microscópicamente, diez cepas bacterianas degradadoras de glifosato, provenientes de suelos agrícolas ubicados en Puerto Quito, Otavalo y Pintag. Mediante una pre-selección de tolerancia a 1 % v/v de glifosato, se escogieron tres cepas (PG54P01, PG54P04, PG54T04), mismas que presentaron una tasa de crecimiento elevada evidenciada mediante espectrofotometría UV-Vis, en comparación al resto de bacterias. La identificación taxonómica se realizó utilizando pruebas miniaturizadas API y el software CrystalMind, determinando que la cepa PG54P04 corresponde a la especie *Burkholderia cepacia* con un 99,74 % de confianza, mientras que la cepa PG54T04 corresponde a la especie *Escherichia coli* con un 97,61 % de confianza. La cepa PG54P01 no pudo ser identificada mediante esta metodología. A través de un análisis estadístico se determinó que la cepa PG54P01 tuvo una tolerancia máxima a una concentración de 0,40 % (v/v), mientras que, PG54P04 y PG54PT04 tuvieron una tolerancia máxima a una concentración de 0,80 % (v/v) de glifosato, siendo PG54P04 la cepa más tolerante a distintas concentraciones. Finalmente, mediante cromatografía de capa fina (TLC) se evaluó la capacidad de biodegradación de glifosato por las tres cepas bacterianas en un tiempo de 5 y 15 días, observándose una mayor degradación a los 15 días de ensayo.

**Palabras clave:** glifosato, microorganismos, biodegradación, TLC.

## Abstract

In this investigation, the glyphosate biodegradation was analyzed from isolated microorganisms obtained from glyphosate contaminated soil. Ten glyphosate-degrading bacterial strains from agricultural soils located in Puerto Quito, Otavalo and Pintag were isolated and characterized, macro- and microscopically. A pre-selection of incubated strains with 1 % v/v of glyphosate was made, afterwards three strains were chosen (PG54P01, PG54P04, PG54T04), which showed a high growth rate evidenced by UV-Vis spectrophotometry, in comparison to the rest of the bacteria. The taxonomic identification was achieved using miniaturized API tests and the CrystalMind software, determining that the strain PG54P04 corresponds to the species *Burkholderia cepacia* with 99,74 % certainty, while the strain PG54T04 corresponds to the species *Escherichia coli* with a 97,61 % certainty. Strain PG54P01 could not be identified by this method. Through a statistical analysis it was determined that PG54P01 had a maximum tolerance at 0,40 % (v/v) glyphosate concentration, whereas, PG54P04 and PG54PT04 had a maximum tolerance at 0,80 % (v/v) glyphosate concentration, PG54P04 is the most tolerant strain at different concentrations. Furthermore, the biodegradation capacity, in 5 and 15 days, was analyzed with Thin Layer Chromatography (TLC), showing a greater degradation rate after 15 days of testing.

**Keywords:** glyphosate, microorganisms, biodegradation, TLC.

## Introducción

El glifosato (GP) es una sal isopropilamina de N-fosfonometil glicina con enlace covalente carbono-fósforo (C-P) en su estructura (Sviridov A. , Shushkova, Ermakova, Ivanova, & Leontievsky, 2014), utilizada como ingrediente activo en la formulación de un herbicida para la eliminación y control de malezas (pastos anuales y perennes, hierbas de hoja ancha y especies leñosas) en ambientes agrícolas, forestales, paisajísticos e incluso cuerpos de agua, desde 1974 (Zhan, Feng, Fan, & Chen, 2018)

Su modo de acción se basa en la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-fosfato sintetasa (EPSPS) en el sexto paso de la ruta del ácido shikímico, inhibiendo con ello, la síntesis de proteínas, aminoácidos aromáticos (flavonoides, ligninas, cumarinas, taninos) (Zhao, y otros, 2015), compuestos secundarios con funciones defensivas por parte de las células vegetales, sobreacumulación del ácido shikímico y desregulación del metabolismo energético, lo cual resulta en la marchitez de la planta a los 3-7 días de su aplicación (Duke & Powles, 2008).

De acuerdo a estudios realizados en la década de los 80 por Monsanto Chemical Co. (USA) en el herbicida Roundup, se determinó que el glifosato se adsorbe rápidamente a partículas de suelos contaminados, teniendo un tiempo de vida media de degradación sobre los 20 días (Ermakova, y otros, 2010), lo que evita su movilidad y lixiviación, y efectos negativos en el medio ambiente y el ser humano. Sin embargo, su resistencia a la degradación, por el enlace C-P (Van Bruggen, y otros, 2018), el uso intensivo del herbicida, así como las prácticas de aplicación inadecuadas por más de 30 años, han resultado en el aumento de sus residuos en plantas y en el medio ambiente (suelo y cuerpos de agua), pudiendo afectar a la salud humana y animal, al degradar las células

vivas y provocar mutaciones genéticas, así como a la microbiota nativa del suelo (Ermakova, y otros, 2010; Ruiz, 2012).

Actualmente, la utilización de organismos vivos o sus metabolitos para la transformación de compuestos xenobióticos y contaminantes en una fuente de energía, nutrientes o sustancias menos tóxicas, ha surgido como la mejor estrategia para la remediación de suelos contaminados con glifosato, esto al considerar la alta resistencia del glifosato a la degradación química y a la fotodescomposición. Así, se ha descrito que la biodegradación de glifosato mediante microorganismos pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* (Liu, McLean, Sookdeo, & Cannon, 1991) es viable.

A través de distintas rutas metabólicas, el glifosato se degrada en tres metabolitos principales: ácido aminometilfosfónico (AMPA), sarcosina y acetilglifosato, así como en glioxilato y fósforo inorgánico (Pi) (Zhan, Feng, Fan, & Chen, 2018). Las principales rutas de degradación del glifosato son: a) escisión directa del enlace C-P con la formación de sarcosina y Pi y, b) rompimiento del enlace C-N con la formación de glioxilato y AMPA ambientalmente estable (Sviridov A. , Shushkova, Ermakova, Ivanova, & Leontievsky, 2014).

Muchas técnicas analíticas han sido utilizadas para monitorear la degradación del glifosato mediante microorganismos, destacando, sobre todo, los análisis cromatográficos, debido a su selectividad, sensibilidad y reproducibilidad. La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica rápida usada para la determinación del número de compuestos en una mezcla y el monitoreo del progreso de una reacción., como Babic, Zelenika, Macan y Kastelan-Macan (2005) lo demostró al utilizar este

análisis en la determinación de glifosato en suelos arenosos rojos, mediante una extracción ultrasónica. Otra técnica analítica para identificar la degradación de glifosato es una modificación de la microdilución en caldo, debido a su gran utilidad para determinar la susceptibilidad de microorganismos a cantidades determinadas de pesticidas, como lo demostró Suheil y Fehmey (2009) al determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Azotobacter* frente a distintos pesticidas, y Bhalerao y Puranik (2007) al evaluar la biodegradación de pesticidas organoclorados por *Aspergillus niger* aislados de suelos.

Debido a la importancia que presenta la biodegradación de glifosato para disminuir sus efectos negativos en el medio ambiente y en la salud humana, es importante trabajar en el aislamiento e identificación de microbiota nativa de suelos, capaz de degradar este compuesto y sus metabolitos de manera eficiente. Por ello, la presente investigación tiene como objetivos: a) aislar microorganismos provenientes de suelo, con capacidad de biodegradación de glifosato e; b) identificar la biodegradación de glifosato mediante técnicas cromatográficas.

# Capítulo 1

## 1.Marco Teórico

### 1.1. Microorganismos

Los microorganismos son los individuos más antiguos, abundantes y diversos localizados en todo tipo de ecosistemas, interactuando con los elementos que lo componen para el desarrollo de la vida, al participar en procesos metabólicos. Actualmente, su importancia se ha incrementado gracias a esta interacción con los ecosistemas, pudiendo ser utilizados para el desarrollo de investigaciones en el campo biotecnológico, ambiental, alimenticios y sanitario (Madigan & Martinko, 2009; Guzmán, 2018).

#### 1.1.1. Microorganismos presentes en el suelo

En el suelo se encuentran diferentes microorganismos: procariotas, arqueas, hongos y algas, que en conjunto forman una comunidad muy diversa y utilizan una gama de rutas metabólicas para aprovechar los nutrientes existentes en esta matriz. Generalmente en los poros de las partículas del suelo es en donde se encuentra la mayor cantidad de microorganismos (Leboffe & Pierce, 2011), los cuales intervienen directamente en los ciclos biogeoquímicos de diferentes elementos químicos, así como en la degradación y mineralización de materia orgánica. Estas funciones son de interés agrícola para conseguir una agricultura sostenible y evitar la erosión de suelos (Bustos, 2012).

La microbiota del suelo es más compleja y diversa que otros ambientes como el marino; sin embargo, se calcula que sólo el 1 % de esta microbiota ha podido ser cultivada debido a sus estrictos requerimientos nutricionales y de condiciones ambientales (Fuerst, 2014).

## **1.2. Aislamiento de microorganismos**

Los cultivos puros son fundamentales para el estudio de microorganismos, por lo que es indispensable seguir metodologías estrictas de aislamiento y purificación. Generalmente el aislamiento se da a través de diluciones seriadas en medios líquidos, métodos de agotamiento de asa en medios sólidos o medios selectivos; para el aislamiento de microorganismos tolerantes a glifosato se utilizan medios enriquecidos con este herbicida en diferentes concentraciones para favorecer sólo el crecimiento de los microorganismos de interés (Benavides, 2007).

Se realiza además una combinación de estos métodos para facilitar el aislamiento. Con relación a las diluciones se debe tomar en cuenta el número de dilución ya que las primeras diluciones ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) suelen contener una gran carga microbiana dificultando el crecimiento de cepas puras mientras que en muestras muy diluidas ( $10^{-7}$  a  $10^{-10}$ ), la carga microbiana no es significativa con respecto a los microorganismos presentes en la matriz inicial (Fuerst, 2014); sin embargo, en microorganismos desconocidos resulta difícil obtener cepas aisladas puesto que se desconoce sus requerimientos fisiológicos para su crecimiento en el laboratorio (Madsen, 2016).

Por esta razón, sólo un bajo porcentaje de los microorganismos del suelo pueden ser cultivados (Madsen, 2016). En el suelo y los rizomas de diferentes especies vegetales existe una gran diversidad de microorganismos, los cuales no han podido ser aislados y se cree que presentan una amplia riqueza de compuestos químicos; por ello, gracias a las técnicas de la metagenómica, se puede realizar una exploración de productos de interés de microorganismos del suelo que no habían sido aislados (Handelsman, Rondon, Brady, Clardy, & Goodman, 1998).

Es necesario contar con cultivos puros para el estudio de microorganismos; por lo que se precisa seguir metodologías de aislamiento y purificación. Sin embargo, en microorganismos desconocidos resulta difícil obtener cepas aisladas puesto que se desconoce sus requerimientos fisiológicos para su crecimiento en el laboratorio. Por esta razón, sólo un bajo porcentaje de los microorganismos del suelo pueden ser cultivados (Madsen, 2016).

### **1.3. Caracterización de microorganismos**

#### **1.3.1. Tinción Gram**

Tipo de tinción que constituye una de las primeras etapas para la identificación bacteriana. Permite distinguir la morfología e identificar si pertenecen a dos grandes grupos, descritos por Christian Gram en 1884: Bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas (Gamazo, López-Goñi, & Díaz, 2005).

Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa, compuesta por aproximadamente 80 % a 90 % de peptidoglicanos, provocando una mayor retención de colorante en dicha pared, pudiéndose observar coloraciones violetas o moradas en el microscopio. Mientras que, las bacterias Gram negativas poseen entre 10 % a 20 % de peptidoglicanos, teniendo una baja capacidad para la retención de colorantes, observándose una coloración fucsia o rosada. Sin embargo, se pueden obtener resultados falsos cuando se utilizan cepas en fase estacionaria, puesto que bacterias Gram positivas pasan por procesos de autólisis de su capa de peptidoglicanos, pareciendo bajo el microscopio como bacterias Gram negativas (Lobos, 2017).

#### **1.3.2. Tinción de esporas**

Las esporas son estructuras intracelulares adaptadas para la sobrevivencia en ambientes adversos, que permiten resistir a condiciones extremas de diferentes

factores físicos como temperatura, sequía, pH y radiación por largos periodos de tiempos. Una vez que las condiciones vuelven a ser favorables, la espora germina en una única célula vegetativa. Poseen una pared gruesa constituida por peptidoglicanos y queratina, una alta hidrofobicidad, siendo pocos los géneros bacterianos generadores de esporas, como *Bacillus* y *Clostridium* (Aguilar, Arce, Galiano, & Torres, 2016).

La coloración de las esporas se da gracias al calentamiento de las muestras. A diferencia de la tinción Gram, en esta técnica se utilizan cultivos en fase estacionaria, de esta forma se asegura que las bacterias han comenzado a producir estructuras de resistencia cuando comienza la carencia de nutrientes (Gamazo, López-Goñi, & Díaz, 2005).

De esta manera, existen esporas esféricas conocidas como “palillo en tambor” porque tienden a deformar la célula vegetativa y se encuentran en los extremos de la bacteria, un ejemplo es *Clostridium tetani*. También existen esporas denominadas “en huso”, por su forma elipsoidal, localizadas en el centro de la célula y deforman esta parte de la bacteria y esporas cilíndricas que se encuentran cercanas a los extremos y no deforman a la célula vegetativa, como *Bacillus megaterium* (Leboffe & Pierce, 2011).

### **1.3.3. Pruebas bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas se han desarrollado con el propósito de demostrar una determinada característica bioquímica (ausencia o presencia de una actividad enzimática, grupo de enzimas, vía metabólica, crecimiento en presencia de inhibidores) de un microorganismo al interactuar con el entorno. Esta interacción es propia de cada género y especie microbiano, y está establecida por el genotipo de cada individuo.

#### **1.3.4. Catalasa**

Esta prueba tiene el objetivo de diferenciar entre los géneros microbianos como *Micrococcus* y *Staphylococcus* (catalasa +), de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (catalasa -). Su fundamento se basa en la presencia de la enzima catalasa, que en bacterias aerobias y anaerobias facultativas es utilizada como protección del efecto tóxico del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), la cual descompone el  $H_2O_2$  en agua ( $H_2O$ ) y oxígeno gaseoso ( $O_2$ ), con producción de burbujas (Madigan, Martinko, & Brock, 2009)

#### **1.3.5. Oxidasa**

Esta prueba permite identificar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la enzima oxidasa se produce por la presencia de un sistema citocromo-oxidasa, el cual activa la oxidación del citocromo c, siendo reducido por el oxígeno molecular ( $O_2$ ) produciendo  $H_2O_2$  o  $H_2O$ , dependiendo de la especie; si se produce dicha reacción se observa un viraje de color azul. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo se encuentra en bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas, mientras que, bacterias anaerobias estrictas carecen de la enzima oxidasa (Gamazo, López-Goñi, & Díaz, 2005).

#### **1.3.6. Indol**

Esta prueba bioquímica se basa en la formación de un complejo rojo o rojo-violeta cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído, determinando la capacidad de un aislado microbiano para hidrolizar y desaminar el triptófano, mediante el complejo enzimático triptofanasa produciéndose indol, ácido pirúvico, amoníaco y energía (Pachón, 2009). En caso de que el resultado sea negativo, se generará un complejo amarillo; mientras que, si el resultado es variable, existirá un

complejo anaranjado por la presencia de escatol, otro producto de la degradación del triptófano (Madigan, Martinko, & Brock, 2009).

### **1.3.7. Sistemas miniaturizados API (Analytical Profile Index)**

Estos sistemas son métodos rápidos para la identificación de microorganismos a partir de la realización de diferentes pruebas bioquímicas simultáneas, en un dispositivo compacto de plástico con varios microtubos que contienen distintos medios de cultivo deshidratados o sustratos enzimáticos específicos (Pachón, 2009). A nivel comercial, existen distintos sistemas miniaturizados o pruebas API para la identificación de diferentes tipos de microorganismos, variando en composición y número de pruebas, factores relacionados directamente con el microorganismo a identificar (Madigan, Martinko, & Brock, 2009).

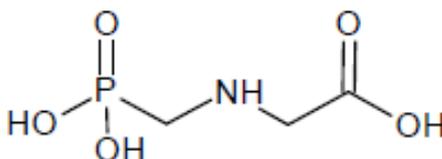
- **Sistema de identificación de bacterias entéricas/no fermentadoras:** Usado para la identificación de bacterias aeróbicas Gram negativas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, así como de algunos bacilos Gram-negativos fermentadores y no fermentadores de glucosa. Se basa en la degradación específica de 30 sustratos cromogénicos, bioquímicos y enzimáticos, por aislados microbianos, considerando tanto una reacción de fermentación, como una de oxidación. Así, se obtiene un perfil bioquímico el cual será leído en un software específico (Pachón, 2009).
- **Sistema de identificación de bacterias Gram positivas:** Usado para la identificación de bacterias aerobias Gram positivas. Se basa en la degradación de 29 sustratos bioquímicos y enzimáticos convencionales, fluorogénicos y cromogénicos por aislados microbianos, detectando su capacidad para hidrolizar, degradar o reducir. Así, se obtiene un perfil bioquímico, el cual será leído en un software específico (Pachón, 2009).

## 1.4. Glifosato

### 1.4.1. Descripción

El glifosato es una sal isopropilamina de N-fosfonometil glicina con enlace covalente carbono-fósforo (C-P) en su estructura, como se observa en la figura 1, (responsable de su alta estabilidad térmica y química, lo que aumenta su persistencia en el ambiente en comparación con sus análogos organofosforados, que poseen enlaces O-P) y peso molecular de 228,18 g/mol (Pimenta, y otros, 2013; Sviridov A. , Shushkova, Ermakova, Ivanova, & Leontievsky, 2014).

#### Estructura química del glifosato (GP)



**Figura 1.** Molécula de glifosato con grupos funcionales fosfato, amino y carbonilo

**Fuente:** (Pimenta, y otros, 2013)

Se caracteriza por ser una molécula polar, post-emergente, no selectiva, altamente soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos, y de acción sistemática (Ruiz, 2012). Es utilizado como principio activo de herbicidas que, al degradarse mediante rutas catabólicas, produce intermediarios como el ácido aminometilfosfónico (AMPA), glioxilato, sarcosina y fósforo inorgánico (Pi) (Schneider, Carmo, Takaki, Stuelp, & Ribeiro, 2014). Además, posee una vida media de 30 a 174 días en el suelo y su dosis letal LD<sub>50</sub> es de 3540-5600 mg/kg (Duke & Powles, 2008).

### 1.4.2. Usos

El glifosato es usado como ingrediente activo en formulaciones herbicidas al ser un compuesto de amplio espectro y no selectivo, utilizado en la eliminación de malezas indeseables (pastos anuales y perennes, hierbas de hoja ancha y especies leñosas) en ambientes agrícolas, forestales, paisajísticos e incluso canales de agua, desde 1974 (Zhan, Feng, Fan, & Chen, 2018).

Su modo de acción se basa en la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-fosfato sintetasa (EPSPS) en el sexto paso de la ruta del ácido shikímico, inhibiendo con ello, la síntesis de proteínas, aminoácidos aromáticos (flavonoides, ligninas, cumarinas, taninos) (Zhao, y otros, 2015), compuestos secundarios con funciones defensivas por parte de las células vegetales, sobreacumulación del ácido shikímico y desregulación del metabolismo energético, lo cual resulta en la marchitez de la planta a los 3-7 días de su aplicación (Duke & Powles, 2008; Sviridov A. , Shushkova, Ermakova, Ivanova, & Leontievsky, 2014).

Debido a su hidrosolubilidad, se lo utiliza mezclado con ingredientes inertes (surfactantes como polioxietileno amino o POEA), los cuales permiten la fijación y translocación del ingrediente activo a través del follaje de la planta (Zhan, Feng, Fan, & Chen, 2018). Por ello, los productos que utilizan GP como principio activo son usados principalmente antes de la siembra en cultivos agrícolas tradicionales y, en la actualidad, después de la siembra de cultivos genéticamente modificados resistentes al glifosato como la soya, maíz, trigo, caña de azúcar y algodón (Van Bruggen, y otros, 2018).

### **1.4.3.Efectos**

De acuerdo a estudios realizados en la década de los 80 por Monsanto Chemical Co. (USA) en el herbicida Roundup, se determinó que el glifosato se degrada rápidamente en suelos contaminados, teniendo un tiempo de vida media de degradación sobre los 20 días (Ermakova, y otros, 2010). Sin embargo, su resistencia a la degradación (por el enlace C-P) (Van Bruggen, y otros, 2018), el uso extensivo del herbicida, así como las prácticas de aplicación inadecuadas por más de 30 años, han resultado en el aumento de sus residuos en plantas y en el medio ambiente (suelo y cuerpos de agua), pudiendo afectar a la salud humana y animal, al degradar las células vivas y provocar mutaciones genéticas (Ermakova, y otros, 2010; Ruiz, 2012).

### **1.4.4.En suelo**

Debido a la carga eléctrica positiva y a los tres grupos funcionales (carboxil, amino y fosfonato) del glifosato, este se adsorbe fuertemente en las partículas coloidales electronegativamente cargadas del suelo y en la materia orgánica, disminuyendo o promoviendo la degradación microbiana (Pimenta, y otros, 2013) al ser utilizado como única fuente de carbono o fósforo. De esta manera, inhibe la población de los hongos del suelo y cambia la composición de la microbiota, siendo un agente ambiental de selección (Agboola, y otros, 2018).

La inmovilización acelerada del glifosato también se debe a su característica de ácido poliprótico que, al encontrarse en solución, forma aniones mono y divalentes afines por cationes trivalentes como el  $Al^{3+}$  y  $Fe^{3+}$  en un rango de pH de 4 a 8, comunes en muchos tipos de suelos. Además, es necesario destacar que la vida media del GP en el suelo varía de 2 a 197 días y su acumulación depende no sólo de la textura, sino del tipo de suelo, de las condiciones climáticas y el nivel de actividad microbiana (Schneider, Carmo, Takaki, Stuelp, & Ribeiro, 2014)

Por ello, el glifosato como sus residuos pueden persistir más de un año en el suelo con alto contenido de arcilla (Van Bruggen, y otros, 2018), debido a su textura y pH característicos, causando efectos continuos en el ecosistema del mismo (Zhao, y otros, 2015), al inhibir el crecimiento de microorganismos endógenos (Zhan, Feng, Fan, & Chen, 2018).

#### **1.4.5. En agua**

Antiguamente, se creía que el glifosato no era un problema considerable para aguas superficiales y subterráneas, debido a su bajo potencial para moverse a través del suelo y contaminar recursos marinos (Pimenta, y otros, 2013; Sviridov A. , Shushkova, Ermakova, Ivanova, & Leontievsky, 2014). Sin embargo, pese a su adhesión a materia orgánica y partículas del suelo, el glifosato y el AMPA terminan en la fase disuelta en el agua subterránea después de una intensa lluvia. Tanto la lluvia como la erosión pueden transportar partículas de suelo con glifosato y AMPA hacia superficies marinas (Ruiz, 2012).

Los residuos de glifosato y AMPA disueltos en aguas superficiales pueden llegar a incorporarse a los sedimentos del fondo, siendo su biodegradación más lenta (Schneider, Carmo, Takaki, Stuelp, & Ribeiro, 2014); además puede afectar a la vida acuática ya que, el surfactante comúnmente utilizado con este pesticida, el polioxietilenoamina (POEA) es relacionado con efectos tóxicos para la peces y otros animales acuáticos (Nardo, y otros, 2015). Se estima que el 3 % de glifosato puede ser encontrado en ambientes marinos (Sviridov A. , Shushkova, Ermakova, Ivanova, & Leontievsky, 2014).

#### **1.4.6. En vegetales**

El glifosato es tóxico tanto para plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. El glifosato y sus residuos de glifosato, disminuyen la fotosíntesis a través de diferentes mecanismos como: aumento de la degradación clorofítica, a la vez que AMPA disminuye la biosíntesis clorofítica. Ambos mecanismos resultan en el amarillamiento y necrosis del follaje (Sviridov A. , Shushkova, Ermakova, Ivanova, & Leontievsky, 2014).

Las plantas tratadas con glifosato no producen compuestos aromáticos secundarios como fitoalexinas antimicrobianas, debido a la inhibición de EPSPS, necesarias en la defensa contra patógenos como especies de *Fusarium* presentes en el suelo de cultivos agrícolas (Pimenta, y otros, 2013; Zhao, y otros, 2015).

El principal producto de la degradación de glifosato, AMPA, está involucrado en la deficiencia de la reparación de ADN y en la síntesis de ARNm tanto en plantas como en animales. Además, cantidades subletales tanto de glifosato como de AMPA fueron detectadas en frutos y brotes de plantas cultivadas de consumo del ser humano (Sviridov A. , Shushkova, Ermakova, Ivanova, & Leontievsky, 2014).

#### **1.4.7. En salud**

Durante mucho tiempo se pensó que la toxicidad del glifosato era nula o relativamente baja para los mamíferos ya que, la vía del ácido shikimico es específica para plantas y microorganismos. Sin embargo, se ha demostrado que este compuesto presenta genotoxicidad y toxicidad cutánea en personas que viven en áreas donde se usa intensivamente este compuesto, generando inhibición de la actividad succinato deshidrogenasa mitocondrial (Schimpf, Milesi, Ingaramo, & Varayoud, 2017), resultando en la muerte de células umbilicales, embrionarias y placentarias en células de humanos (Zhan, Feng, Fan, & Chen, 2018; Zhao, y otros, 2015; Sviridov A. ,

Shushkova, Ermakova, Ivanova, & Leontievsky, 2014). Además, en ensayos in vitro se ha comprobado el daño que causan concentraciones significativas de AMPA en cultivos de eritrocitos (Zhan, Feng, Fan, & Chen, 2018).

#### **1.4.8. En microorganismos**

Varios estudios demuestran que el glifosato, según la frecuencia de aplicación en suelo agrícola, afecta a la comunidad microbiana ya sea de manera transitoria o indefinida. Esto se debe a la inhibición de EPSPS de la ruta del ácido shikímico por el glifosato, suprimiendo la síntesis de proteínas necesarias y metabolitos secundarios, así como en rutas metabólicas energéticas esenciales para los microorganismos (Zhan, Feng, Fan, & Chen, 2018).

El glifosato también puede generar cambios estructurales en las comunidades bacterianas por inhibición del crecimiento de los microorganismos del suelo, facilitando a su vez, el incremento de hongos fitopatógenos en el suelo (Zhao, y otros, 2015). Además, considerando que el metabolismo interno de AMPA es imposible, cualquier reacción que facilite esto, puede desencadenar una serie de contaminantes secundarios (Schneider, Carmo, Takaki, Stuelp, & Ribeiro, 2014)

#### **1.5. Biorremediación**

La biorremediación se basa en la utilización de organismos vivos o sus componentes para la transformación de compuestos xenobióticos y contaminantes en una fuente de energía o nutrientes (Bhalerao & Puranik, 2007). Inicialmente, para determinar la factibilidad de estos microorganismos para la biorremediación se realizan ensayos en laboratorio para determinar el grado de degradación del xenobiótico y las condiciones de crecimiento de aquellos microorganismos degradadores (Handelsman, Rondon, Brady, Clardy, & Goodman, 1998).

Considerando la alta resistencia del glifosato a la degradación química y a la fotodescomposición, la biorremediación se presenta como el proceso más eficiente para la remoción de esta molécula en los suelos contaminados. Así, se ha descrito que la mineralización de glifosato mediante microorganismos como *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* (Liu, McLean, Sookdeo, & Cannon, 1991) es viable.

Sin embargo, la biorremediación de glifosato en suelos todavía no es posible debido a la gran variabilidad de metabolización del glifosato y a la necesidad de ensayos más específicos para su degradación (Zhao, y otros, 2015; Zhan, Feng, Fan, & Chen, 2018).

### **1.5.1. Mecanismos de degradación de glifosato mediante microorganismos**

A través de distintas rutas metabólicas, el glifosato se degrada en tres metabolitos principales: ácido aminometilfosfónico (AMPA), sarcosina, acetilglifosato, así como en glioxilato y fósforo inorgánico (Pi) (Zhan, Feng, Fan, & Chen, 2018). Las principales rutas de degradación del glifosato son: 1) escisión directa del enlace C-P con la formación de sarcosina y fósforo inorgánico (Pi) y, 2) rompimiento del enlace C-N con la formación de glioxilato y AMPA ambientalmente estable (Sviridov A. , Shushkova, Ermakova, Ivanova, & Leontievsky, 2014).

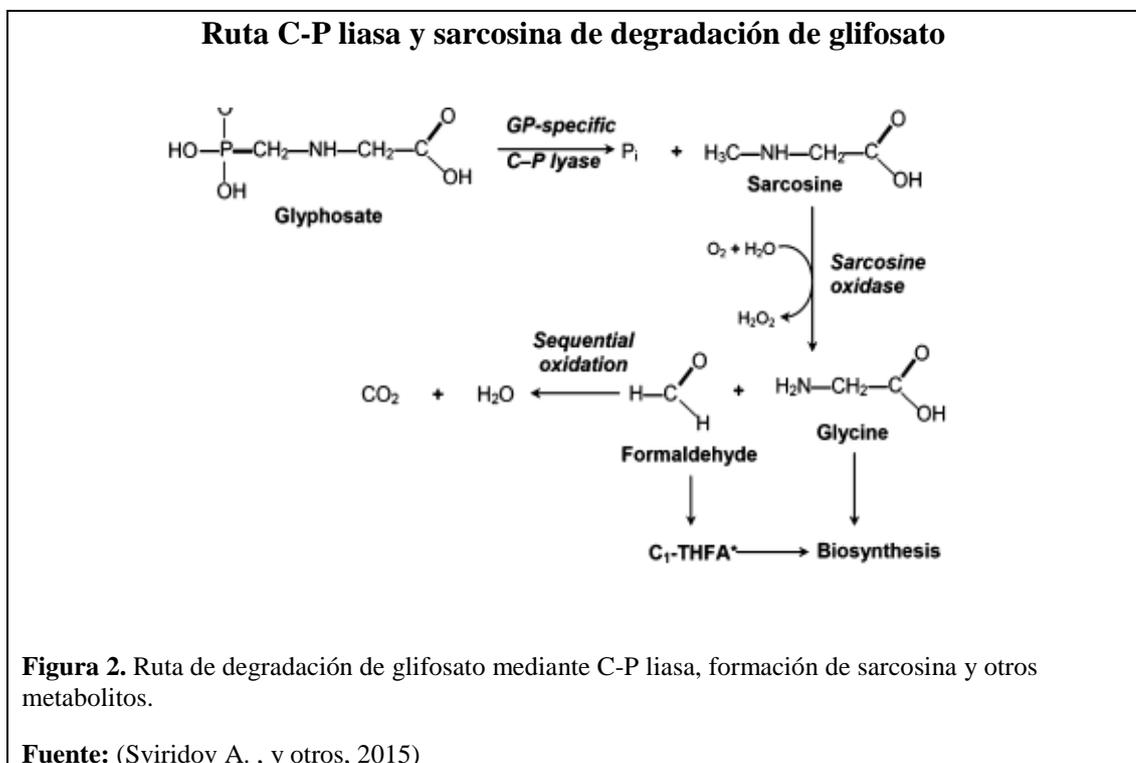
#### **1.5.1.1. Ruta C-P liasa y sarcosina de degradación de glifosato**

Existen dos principales estrategias conocidas de escisión del enlace C-P inerte. Una en la que actúan hidrolasas altamente específicas de sustrato (enlace C-P) y otra basada en la acción de una C-P liasa no específica (Sviridov A. , y otros, 2015).

El enlace inerte C-P es resistente a la hidrólisis química y enzimática, por lo que requiere la acción de un complejo multienzimático conocido como C-P liasa, el cual puede convertir un amplio rango de fosfonatos en Pi, sarcosina y residuos de carbono.

(Sviridov A. , Shushkova, Ermakova, Ivanova, & Leontievsky, 2014; Sviridov A. , y otros, 2015). La sarcosina es rápidamente metabolizada por la sarcosina oxidasa bacteriana en glicina (sustrato común para numerosos procesos anabólicos) y formaldehído (sustrato en la biosíntesis de ácido tetrafólico), como se observa en la figura 2.

El mecanismo de degradación a través de esta ruta es poco estudiado tanto en el ámbito bioquímico como molecular. Los géneros bacterianos que poseen C-P liasas específicas de glifosato presentan una alta eficiencia en la destrucción del herbicida bajo condiciones de laboratorio, al utilizar un medio mineral con glifosato como principal fuente de fósforo. Sin embargo, en ecosistemas naturales, la eficiencia del complejo enzimático es limitada, debido a que el complejo C-P liasa es activado sólo en respuesta al déficit de Pi intracelular y a la deficiencia específica de fósforo, lo cual no es típico en ambientes naturales (Sviridov A. , y otros, 2015).



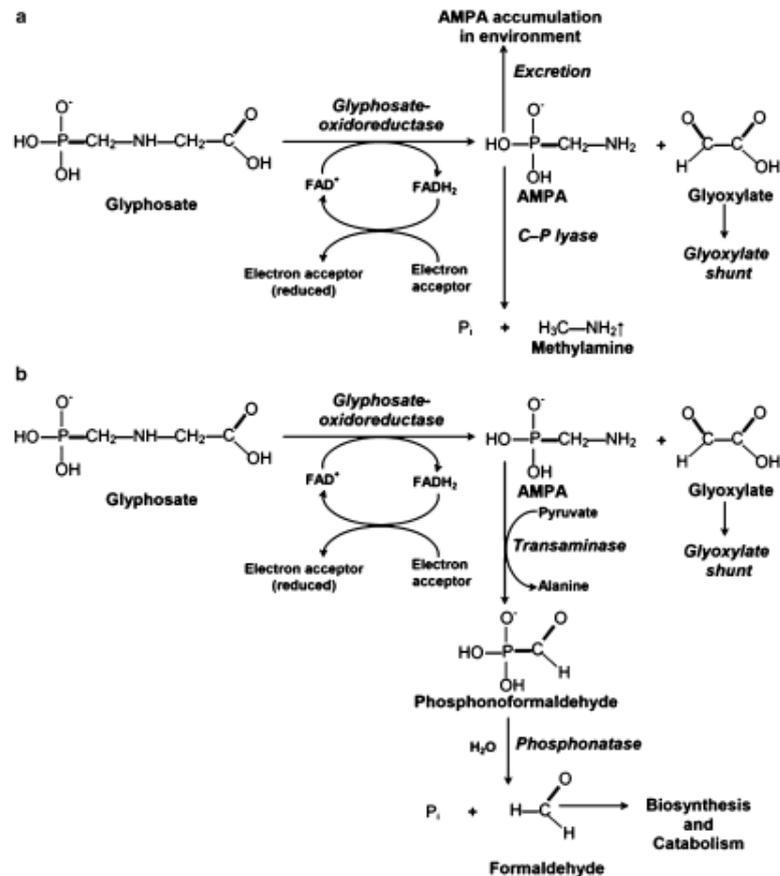
### **1.5.1.2. Ruta AMPA y glioxilato de metabolismo de glifosato**

En esta ruta, la enzima glifosato oxidoreductasa (GOX) facilita el rompimiento del glifosato en cantidades estequiométricas de AMPA y glioxilato, sin necesidad de una regulación por el contenido de Pi (Sviridov A. , Shushkova, Ermakova, Ivanova, & Leontievsky, 2014; Sviridov A. , y otros, 2015), como se observa en la figura 3.

El metabolismo de los productos de la degradación de glifosato mediante GOX pueden variar. Así, el glioxilato es un sustrato energético común, siendo utilizado en el ciclo de Krebs; mientras que, AMPA, en muchos casos, es excretado al espacio extracelular, cuya degradación se deriva finalmente en la producción de CO<sub>2</sub>, fosfatos y agua (Sviridov A. , Shushkova, Ermakova, Ivanova, & Leontievsky, 2014).

Existe otra ruta alternativa por la cual, AMPA se degrada en productos distintos. A esta se la denomina, ruta de la fosfonatasa, la cual está involucrada en la degradación de fosfonatos alfacarbonosustituidos, encontrados en los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* y varios otros microorganismos (Singh & Walker, 2006). En este proceso, la ruptura del enlace C-P se produce por una reacción de hidrólisis que requiere un grupo carbonilo adyacente. El 2-aminoetilfosfonato se convierte en fosfonoacetaldehído por una transaminasa específica, que es degradado a acetaldehído por una fosfonatasa (Singh & Walker, 2006), como se observa en la figura 2.

## Ruta AMPA y glioxilato del metabolismo del glifosato



**Figura 3.** a) Ruta AMPA y glioxilato de metabolismo de glifosato, b) ruta alternativa "fosfonatasa"

**Fuente:** (Sviridov A. , Shushkova, Ermakova, Ivanova, & Leontievsky, 2014)

### 1.6. Técnicas analíticas para la determinación de la biodegradación de glifosato

#### 1.6.1. Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

La espectrofotometría es una de las técnicas analíticas más utilizadas debido a su bajo costo, gran número de aplicaciones, reproducibilidad y permite la determinación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. Esta técnica se basa en la ley de Lambert-Beer ya que es la base matemática para la relación de las medidas de

absorbancia de luz con las propiedades de una sustancia atravesada (Rocha & Teixeira, 2004)

### **1.6.2. Determinación de la sensibilidad mediante microdilución en caldo**

La microdilución en caldo es un método básico utilizado para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana y se presenta como el más apropiado para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y, en el caso de biodegradación de pesticidas, determinar la tolerancia a dichos xenobióticos.

La CMI también es de gran utilidad para determinar la susceptibilidad de microorganismos a cantidades determinadas de pesticidas u otras sustancias contaminantes como lo demostró (Suheil & Fehmey, 2009) al determinar la concentración mínima inhibitoria de *Azotobacter* frente a distintos pesticidas, y al evaluar la biodegradación de pesticidas organoclorados por *Aspergillus niger* aislado de suelos (Bhalerao & Puranik, 2007).

El procedimiento implica la preparación de diluciones dobles del agente antimicrobiano en un medio de cultivo líquido dispensando en una placa de 96 pocillos, en los cuales se inocula el microorganismo de prueba preparado en solución salina estéril y ajustado a una concentración de  $(1-2) \times 10^8$  UFC (unidad formadora de colonia)/mL para bacterias o  $(1-5) \times 10^6$  UFC/mL para hongos (Carlone & Pompei, 2013), mediante el uso de un espectrofotómetro UV. Después de mezclar bien los pocillos inoculados se realiza la microdilución y se incuba en condiciones adecuadas dependiendo del microorganismo de prueba (Balouiri, Sadiki, & Ibsouda, 2016).

Para la obtención de resultados medibles, se determinan los cambios en la turbidez de las placas a través de la absorbancia en un espectrofotómetro con ayuda de un colorante. El colorante más utilizado es el Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio, conocido

como TTC, el cual es un indicador de la respiración celular y su visualización de viraje se observa en poco tiempo (Bhalerao & Puranik, 2007).

El compuesto se torna de color rojo en presencia de enzimas deshidrogenasas, mientras que permanece incoloro en ausencia de dichas enzimas, debido a que han sido desnaturalizadas o degradadas; sin embargo, una desventaja de este colorante es el incremento de lisis celular por la acumulación de cristales del colorante en el interior. Esto se ve disminuido con sales de nueva generación, conocido como XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) (Carlone & Pompei, 2013).

### **1.6.3. Cromatografía**

La cromatografía es una técnica analítica para la separación, identificación y cuantificación de elementos que conforman una mezcla al distribuirse entre dos fases: una fase móvil y una fase estacionaria (Coskun, 2016). Esta técnica se da como resultado de fuerzas de sorción-desorción durante el movimiento relativo de las moléculas de la mezcla por la fase móvil a través de una fase estacionaria, produciéndose una distribución diferencial de los componentes entre ambas fases (Cai, 2012).

#### **1.6.3.1. Cromatografía en capa fina**

Thin layer chromatography (TLC) o cromatografía en capa fina es un tipo de cromatografía sólido-líquido en que, la fase estacionaria es un adsorbente polar inerte (óxido de aluminio, sílica gel) acoplado a una superficie de plástico, vidrio o aluminio (Cai, 2012). La fase estacionaria más utilizada es la sílica gel, la cual presenta una estructura de tetraedros de óxido de silicio presentando poros de tamaño entre 80 a 150 Dalton, de carácter polar y ácido, con grupos silano y siloxano que pueden separar

compuestos al generarse enlaces de hidrógeno, fuerzas dipolo-dipolo y fuerzas de dispersión (Coskun, 2016).

La fase móvil o eluyente puede ser un solvente o una combinación de solventes de distinta polaridad, elegida de acuerdo a las propiedades de los compuestos a separar, así como a la solubilidad, afinidad y resolución que presenten los solventes (Cai, 2012). Así, la separación de los compuestos se basa en la competencia entre la muestra y la fase móvil por lugares de unión en la fase estacionaria (Striegel & Hill, 1996) en que, se produce un balance de fuerzas intermoleculares que determinan la posición de equilibrio dependiente de la polaridad de ambas fases y de la muestra.

Esta técnica es rápida y puede ser usada para la determinación del número de compuestos en una mezcla, verificar la identidad de una sustancia, monitorear el progreso de una reacción, determinar la pureza de una sustancia y analizar las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica (Spangenberg, Poole, & Weins, 2011).

### **1.6.3.2. Revelado de la placa**

Para la identificación de las moléculas de interés en una placa cromatografica existen dos procesos de revelado: Visualización no destructiva y derivatización/tinción (Cai, 2012). La visualización no destructiva se basa en la observación de los analitos orgánicos fluorescentes y analitos orgánicos fosforescentes como manchas, al irradiar la placa cromatográfica con luz UV a 254 nm (absorbancia) y 365 nm (fluorescencia) (Cai, 2012; Coskun, 2016). Mientras que, la derivatización/tinción se utiliza cuando los analitos no presentan propiedades fluorescentes, siendo las placas impregnadas con una sustancia química indicadora: ninhidrina, vainillina, ácido sulfúrico, permanganato de potasio, entre otros (Guerrero, 2013; Polo, 2015).

### **1.6.3.3. Determinación del factor de retención ( $R_f$ )**

Para el análisis de TLC se utiliza frecuentemente el valor de la relación entre las distancias recorridas por el soluto y por la fase móvil desde el origen de la placa (Coskun, 2016). A este valor se lo denomina factor de retención ( $R_f$ ). Este valor es constante para cada compuesto, siendo imposible su replicación si no se llevan a cabo las mismas condiciones cromatográficas experimentales, como: fase estacionaria, composición de la fase móvil, cámara cromatográfica, temperatura, cantidad de muestra, entre otras (Cai, 2012).

Para el análisis eficiente de una placa cromatográfica, la localización de las sustancias de interés mediante luz UV o derivatización/tinción, junto con valores de  $R_f$  muestrales comparados con  $R_f$  de patrones, permiten una alta confiabilidad en la identificación de sustancias de interés (Lundanes, Reubsaet, & Greibrokk, 2014; Cai, 2012).

## Capítulo 2

### 2. Materiales y métodos

#### 2.1. Recolección de muestras

Se realizaron tres muestreos en sitios de cultivo agrícolas diferentes, donde se llevan periódicamente aplicaciones de glifosato a la tierra. El primer muestreo se realizó en cultivos de maíz, *Zea mays*, en el cantón Pintag, en la provincia de Pichincha; para el segundo muestreo se tomó suelo de cultivos de palma africana, *Elaeis guineensis*, en el cantón Puerto Quito, en la provincia de Pichincha y la tercera muestra se obtuvo de cultivos rotatorios en el cantón Otavalo, en la provincia de Imbabura.

El muestreo se basó según las indicaciones de la normativa NTE-INEN-ISO 10381, escogiendo un muestreo aleatorio compuesto, evitando escoger muestras de suelo que se encontraran cercanas a calles, caminos o fuentes de agua.

Para la toma de suelo se realizó 10 excavaciones con corte en V con ayuda de una pala, a una profundidad de 15 centímetros y con un ancho de 10 centímetros y se tomó muestras de aproximadamente 200 gramos (INEN, 2014). Estas muestras fueron colocadas en fundas Ziploc y llevadas al Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, donde se homogeneizaron en un solo recipiente. Se conservó 500 gramos de cada suelo a temperatura de 4 °C hasta su uso.

#### 2.2. Aislamiento de microorganismos de suelo con capacidad biodegradadora de glifosato

##### 2.2.1. Siembra en medio con glifosato

Se realizó una suspensión al 0,5 % (v/v) de glifosato comercial, cuya concentración es de 480 mg/mL, como única fuente de carbono, 90 mL de agua peptonada bufferada estéril y 10 gramos de suelo. Esta suspensión se incubó por 5 días a 37 °C. Transcurrido

este tiempo, se realizó una serie de diluciones en suero fisiológico estéril, de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  (Firdous, 2017)

### **2.2.2. Siembra de diluciones**

Para la obtención de microorganismos con capacidad biodegradadora, se sembró 1 mL de cada dilución con ayuda de un asa de Digraleski estéril en placas de medio sólido agar nutritivo y se incubó por 24 horas a 30 °C. Para obtener colonias puras, se identificaron aquellas diluciones en las que se observó un crecimiento más uniforme visualmente del inóculo, considerando su morfología macroscópica, así como la presencia de poca variedad microbiana, lo cual permitiría un mejor aislamiento de cepas de interés. Se resembraron sucesivamente los inóculos identificados en medio agar nutritivo, mediante técnica de estriado por cuadrante, obteniendo cepas puras.

Se rotuló cada cepa de la siguiente manera: PG''S''54(#), en donde PG representa (Proyecto Glifosato); S (Sitio de muestreo: Pintag (P), Puerto Quito (PQ), Otavalo (T)); 54 (Periodo semestral de ensayo) y Numeral # (UFC aislada).

### **2.2.3. Conservación de las cepas aisladas**

Para la conservación de los microorganismos aislados se realizaron siembras, mediante la técnica de pico de flauta, y se incubó a 30 °C por 24 horas; posteriormente fueron almacenadas a 4 °C para contar con un cepario, a manera de respaldo para futuras investigaciones.

## **2.3. Caracterización de microorganismos con capacidad biodegradadora de glifosato**

Se realizó una valoración macroscópica y microscópica de las cepas bacterianas seleccionadas, las cuales poseen capacidad degradadora de glifosato. Además, se realizaron pruebas bioquímicas para su identificación.

### **2.3.1. Tinción Gram**

Se utilizó la metodología descrita por López, y otros (2014). Se preparó un frotis bacteriano y se añadió cristal violeta, que actúa como primer colorante, el cual posee afinidad por las cargas negativas de la pared celular, permitiendo la tinción. Se añadió solución mordiente, que suelen ser sales metálicas como el lugol, el cual forma un complejo con la pared celular, siendo insoluble en el caso de bacterias Gram positivas, evitando la salida del cristal violeta. Posteriormente se utilizó un agente decolorante, generalmente etanol-acetona, en proporción 1:1; deshidratando la pared celular, lo que permite la decoloración de bacterias Gram negativas. Finalmente, se añadió un colorante de contraste, safranina, que tiñó aquellas bacterias que han sido decoloradas en el paso previo al no poder retener el complejo cristal violeta-lugol, es decir bacterias Gram negativas.

### **2.3.2. Tinción de esporas**

Se realizaron frotis de cada cepa aislada en un portaobjetos. Se utilizó verde malaquita como colorante ya que, tiñe las esporas y otras estructuras bacterianas cuando se calientan; se lavó con agua destilada, provocando una decoloración de estructuras bacterianas a excepción de las esporas. Se añadió safranina, como colorante de contraste y se observó en el microscopio.

### **2.3.3. Prueba de oxidasa**

En un tubo con suero fisiológico, se añadió un frotis del microorganismo de interés utilizando un hisopo estéril y se añadió una tira de oxidasa OxiStrip™ de la marca Hardy Diagnostics. Cuando se observó un viraje del color azul en la tira, se consideró como un resultado positivo, mientras que, cuando el viraje es de color amarillo, se consideró un resultado negativo.

#### **2.3.4. Prueba de catalasa**

En un portaobjetos limpio, se puso una gota de agua destilada y se realizó un frotis del microorganismo con ayuda de un hisopo estéril; se añadieron gotas de agua oxigenada y se identificó la presencia o ausencia de burbujas de aire, las cuales indican desprendimiento de oxígeno, dando un resultado positivo.

#### **2.3.5. Prueba indol**

Se inocularon tubos de ensayo con agua peptonada bufferada estéril con las cepas bacterianas aisladas y se incubó a 35 °C durante 24 horas. Posteriormente, se añadieron 5 gotas de reactivo Kovac y se agitó suavemente. Se identificaron los resultados en cada tubo, siendo positivo si se genera un anillo rojo en la superficie del medio.

#### **2.3.6. Pre-selección de microorganismos tolerantes a glifosato**

Se inoculó agua peptonada bufferada estéril con una UFC de cada cepa aislada y 1 % (v/v) de glifosato como fuente de carbono y fósforo, y se incubó por 5 días. Se midió la absorbancia, la cual es directamente proporcional al crecimiento microbiano (Madigan, Martinko, & Brock, 2009), mediante un espectrofotómetro UV-Vis, antes de la siembra y después de 5 días, determinando las cepas capaces de sobrevivir a una concentración más elevada del xenobiótico. Así, se seleccionaron aquellas bacterias tolerantes a una mayor concentración del herbicida.

### **2.4. Identificación bioquímica de cepas tolerantes a glifosato**

Para bacterias Gram positivo, se utilizó el kit de identificación BD BBL™ Crystal GP y para bacterias Gram negativas el kit de identificación BD BBL™ Crystal™ Enteric/Nonfermenter. Como indica el fabricante, se inoculó una UFC en un medio de cultivo Mac Conkey para bacterias Gram negativas, mientras que para bacterias Gram positivas se utilizó un medio TSA y se incubó por 24 horas.

Con ayuda de un hisopo estéril, se diluyó el inóculo de cada cepa en los tubos BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID, se agitó por 30 segundos y mediante un análisis visual se observó que la turbidez sea equivalente a un patrón McFarland de 0,5 ( $1 \times 10^8$  UFC). Se colocó el contenido del tubo en los paneles del kit hasta que cada pocillo esté cubierto con la solución y se incubaron a 35 °C por 24 horas.

Una vez terminado el tiempo de incubación se observó los virajes de coloración de los paneles y se realizó un perfil bioquímico a través de una comparación con los resultados establecidos por el fabricante, posteriormente este perfil bioquímico fue analizado en una base de datos con ayuda del software Crystal Mind.

## **2.5. Determinación de la tolerancia de los microorganismos a glifosato mediante microdilución en caldo**

### **2.5.1. Preparación de inóculos bacterianos**

Una vez seleccionadas las cepas tolerantes a una concentración de glifosato, se sembraron previamente por 24 horas en medios TSA. Estas cepas fueron resembradas en 5 mL de caldo Mueller Hinton con ayuda de un hisopo estéril, tomando una UFC, a una temperatura de 35 °C por 24 horas. El mismo procedimiento fue realizado para la cepa bacteriana de control *Micrococcus yunnanensis* (ATCC 7468).

Una vez transcurrido el tiempo necesario, el caldo de cultivo se colocó en tubos falcon estériles y se centrifugó en la centrífuga de marca HERMLE Z400 por 20 minutos a 3000 rpm; se desechó el sobrenadante, quedando las bacterias precipitadas en el fondo de los tubos. Para la resuspensión se utilizan aproximadamente 5 mL de caldo Mueller Hilton estéril y se llevó a agitación en un vórtex de marca Labnet por 3 minutos.

Para la estandarización de los microorganismos se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis JASCO V-730, a una longitud de onda de 625 nm, obteniendo una absorbancia

entre 0,08 a 0,11, propio de un inóculo bacteriano de  $1-2 \cdot 10^8$  UFC/mL (Carlone & Pompei, 2013).

### **2.5.2. Determinación de la tolerancia a glifosato mediante microdilución en caldo**

Se utilizó la metodología de Suheil y Fehmey (2009) para determinar la tolerancia de microorganismos al herbicida. Se usaron placas multipocillos estériles de poliestireno de alta transparencia de 96 pocillos de marca VWR®, colocando las muestras con ayuda de una micropipeta multicanal de 12 canales.

Se llenó la fila A de la microplaca con 100  $\mu$ L de caldo de cultivo Mueller Hinton y 50  $\mu$ L de glifosato comercial a una concentración de 12,5 % (v/v), a excepción del pocillo A<sub>10</sub>, que se llenó con 150  $\mu$ L de caldo de cultivo y 50  $\mu$ L de glifosato, siendo este el control de esterilidad del ensayo. De la siguiente fila en adelante (B-H), se incorporaron 100  $\mu$ L de caldo de cultivo Mueller Hinton. Posteriormente, con ayuda de la micropipeta multicanal, se mezcló y se traspasó 50  $\mu$ L de la primera fila (A), y así sucesivamente hasta la última fila (H), desechando los 50  $\mu$ L sobrantes.

Las concentraciones obtenidas luego de la dilución de glifosato en cada pocillo se encuentran determinadas en la tabla 1.

**Tabla 1.**

Diseño de la placa de multipocillos con las concentraciones ( % (v/v)) de glifosato utilizadas

Cepa Co.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	-	12,5	12,5
B	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	-	6,3	6,3
C	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	-	3,2	3,2
D	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	-	1,6	1,6
E	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	-	0,8	0,8
F	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	-	0,4	0,4
G	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,2	0,2
H	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1

**Nota:** Las cepas fueron colocadas en las columnas 1-12 de la placa; las concentraciones fueron colocadas en las filas A-H.

**Elaborado por:** Los autores (2019)

Se colocó 50 µL de los inóculos bacterianos de las cepas aisladas previamente, de la siguiente manera en la placa multipocillo:

- En las columnas 1, 2 y 3, se colocó 50 µL de la cepa bacteriana PG54P01.
- En las columnas 4, 5 y 6, se colocó 50 µL de la cepa bacteriana PG54P04.
- En las columnas 7, 8 y 9, se colocó 50 µL de la cepa bacteriana PG54T01.
- En la columna 10 no se inocularon cepas bacterianas, sirviendo como control de esterilidad.
- En las columnas 11 y 12, se colocó 50 µL de la cepa bacteriana *Micrococcus yunnanensis* (ATCC 7468), como control positivo de ensayo.

Una vez inoculados los pocillos, con un volumen final de 150  $\mu$ L en cada uno, se incubó la microplaca por 24 horas a una temperatura de 35 °C y agitación lenta de 40 rpm, en una incubadora magnética TECNAL TE-420.

### **2.5.3. Adición del colorante cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)**

En una balanza analítica Mettler Toledo modelo 1204 se pesó 10 mg de colorante TTC y fue aforado en 10 mL de agua destilada estéril, obteniendo una concentración de 1 % (v/v). Después de que las placas multipocillo fueron incubadas por 24 horas se añadió 40  $\mu$ L a cada pocillo con ayuda de una micropipeta multicanal, se incubó por 30 minutos, a 35 °C de temperatura y 40 rpm de agitación. El colorante TTC es termolábil y fotosensible, por lo que antes de su uso, es necesario su cubrimiento con papel de aluminio y refrigeración a 4 °C para evitar su descomposición.

### **2.5.4. Lectura de placas multipocillo**

Pasado el tiempo de incubación, se observaron los pocillos coloreados de rojo intenso, lo cual indica cualitativamente el crecimiento y la tolerancia de las cepas bacterianas a las diferentes concentraciones de glifosato. Posteriormente, se leyó la absorbancia de la placa multipocillo en el equipo Microplate Reader, el cual tiene integrado un espectrofotómetro UV-Vis, realizando la lectura a una longitud de onda de 650 nm.

### **2.5.5. Determinación del Log UFC/mL mediante curva de calibración**

Para la identificación de las mejores bacterias tolerantes a glifosato, se elaboraron curvas de calibración de crecimiento de cada cepa, lo cual permitió la cuantificación de UFC/mL de cada inóculo a partir de la ecuación de la recta. Para ello, se inocularon las cepas bacterianas PG54P01, PG54P04 y PG54T04 en 10 mL de agua peptonada estéril y se incubó durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, se midió la turbidez de cada inóculo mediante un espectrofotómetro UV-Vis JASCO V-730 a una longitud de onda de 625 nm, considerando distintos valores de escala McFarland, los cuales indican una determinada UFC/mL cada uno, como se observa en la tabla 2.

**Tabla 2.**

Relación entre 5 puntos de escala McFarland y UFC/mL

Escala McFarland	UFC/mL
0,5	$1.5 \cdot 10^8$
1	$3 \cdot 10^8$
2	$6 \cdot 10^8$
3	$9 \cdot 10^8$
4	$12 \cdot 10^8$

**Fuente:** (Carlone & Pompei, 2013)

Una vez finalizada la lectura de cada bacteria en las escalas McFarland propuestas, se construyeron las curvas de calibración con 5 puntos y se obtuvo la ecuación de la recta para cada inóculo bacteriano (Céspedes, 2012), a partir de la cual, se determinó el UFC/mL de cada cepa, valor que se transformó a Log UFC/mL para tener uniformidad de la varianza, considerando las absorbancias obtenidas en la lectura de las placa multipocillo, pudiendo analizar estadísticamente los resultados.

$$y(A) = mx(U) + b$$

En donde,

**y(A):** Absorbancia medida por el lector Microplate Reader, de cada pocillo.

**m:** Pendiente de la recta.

**x(U):** UFC/mL de cada cepa bacteriana.

**b:** Ordenada en el origen (intersección de la recta en el eje de ordenadas).

### 2.5.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico ANOVA, se aplicó un análisis factorial 3x8 (UFC/mL x concentración de glifosato), como se observa en la tabla 3, en el cual se evaluó la tolerancia que presentaban las bacterias a determinadas concentraciones de glifosato, de acuerdo a su crecimiento. Se evaluó la UFC/mL, la concentración de glifosato y la interacción entre la UFC/mL x concentración de glifosato, así como los tratamientos generados, mediante pruebas Post Hoc de Duncan 5 %. El análisis se llevó a cabo mediante el programa INFOSTAT versión 2015.

**Tabla 3.**

Diseño experimental para el análisis factorial de la UFC/mL

<b>Factor 1</b>	<b>Cepa bacteriana</b>	PG54P01
		PG54P04
		PG54T04
<b>Factor 2</b>	<b>Concentración de glifosato ( % (v/v))</b>	12,5
		6,3
		3,2
		1,6
		0,8
		0,4
		0,2
		0,1

**Elaborado por:** Los autores (2019)

## **2.6. Análisis de la capacidad biodegradadora de glifosato mediante técnicas cromatográficas**

### **2.6.1. Selección de la fase móvil**

De acuerdo a la metodología utilizada por Kastelan-Macan, Macan, Zelenika, & Babic (2005) se preparó 200 mL de las fases móviles con una combinación de solventes polares, afines a la molécula de interés: Etanol/agua/acetato de etilo en las siguientes proporciones: (6:3,5:0,5) v/v; (5:3:2) v/v y (6:2:2) v/v, siendo (5:3:2) v/v la mejor fase móvil que permitió la separación de las moléculas en el menor tiempo y con más eficiencia. Una vez identificada la mejor proporción de fase móvil, se preparó 500 mL de fase móvil para el análisis.

### **2.6.2. Preparación de la muestra**

Se inoculó 10 mL de agua peptonada bufferada estéril con 1 UFC de cada una de las bacterias, y se agregó 0,104 µL de glifosato a una concentración de 2,5 % (v/v). Se incubó durante 5 días en una plancha de agitación a 35 °C y 50 rpm.

Luego de 5 días de incubación, se añadieron 10 mL de metanol grado HPLC a cada una de las muestras. Como estándar, se utilizó 10 mL de glifosato comercial a una concentración de 480 g/L, a la cual se añadió 10 mL de metanol. Las cuatro muestras fueron selladas con una cubierta de papel aluminio con poros para permitir la evaporación del solvente durante 24 horas; debido a que el solvente no se evaporó completamente, se concentró la muestra en un rotavapor de marca IKA® RV modelo 10 basic a 40 °C y 100 rpm durante 15 min.

Posteriormente, se añadieron 25 mL de fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a una concentración de 0,1 M y se colocó en ultrasonido durante 60 min. Los extractos fueron filtrados en papel filtro Whatman 40 y concentrados hasta sequedad a 40 °C y

110 rpm; una vez concentrados, se agregó 2 mL de metanol y se filtraron en microfiltros Rephile de 0,45 µm. Debido a la viscosidad del estándar comercial de glifosato, fue necesario realizar una dilución 1:100 con metanol, previo a la siembra en la placa cromatográfica.

### **2.6.3. Lectura cromatográfica**

Se sembraron 40 µL de muestra en placas de sílica gel marca Sigma-Aldrich® (L×W: 20 cm×10 cm con factor de fluorescencia de 254 nm), utilizada como fase estacionaria para la separación y purificación de los compuestos, con ayuda del equipo LINOMAT-5 (CAMAG), a 1 cm del largo de la placa cromatográfica.

Se saturó una cámara cromatográfica con fase móvil, por un tiempo de 40 minutos para que el solvente arrastre todos los compuestos de la mezcla. Una vez saturada la cámara, se agregó la placa sembrada con las muestras, finalizando la separación de las moléculas hasta que el solvente alcance el límite marcado (8 cm desde el inicio de la siembra) en la placa. Luego de la corrida de las muestras, se secaron los residuos de fase móvil de la placa con una secadora por un tiempo de 15 minutos.

Los componentes se visualizaron mediante una lámpara UV marca CAMAG UV Cabinet, a una longitud de onda de 245 nm (absorbancia) y 365 nm (fluorescencia) y se señalaron las manchas generadas durante la corrida para el cálculo del *R<sub>f</sub>* (factor de retención) de los compuestos activos, mediante la ecuación propuesta por Cai en 2012.

$$R_f = \frac{\text{Distancia desde el punto de aplicación al centro de la mancha}}{\text{Distancia desde el punto de aplicación al frente del eluyente}}$$

Finalmente, se reveló la placa utilizando Ninhidrina 0,2 % (0,6 g de Ninhidrina hidratada en 300 mL de etanol al 96 %), y se calentó a una temperatura de 110 °C durante 10 minutos para eliminar el exceso de residuos.

## Capítulo 3

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Recolección de muestras

Las muestras de suelo escogidas estuvieron expuestas a glifosato de manera periódica por periodos de 5 a 10 años, provocando una acumulación de glifosato adherido a partículas del suelo y el aumento de fosfatos (Gimsing & Borggard, 2002), permitiendo la adaptación de microorganismos a este xenobiótico.

#### 3.2. Aislamiento y caracterización de microorganismos de suelo con capacidad biodegradadora de glifosato

A pesar de que se encuentra bien documentado que el glifosato es altamente metabolizado por microorganismos, en este estudio se aislaron 10 microorganismos degradadores de glifosato de las diferentes muestras de suelo expuestas al herbicida, en contraste con el estudio de (Forlani, Mangiagalli, Nielsen, & Suardi, 1999) donde se utilizó una matriz de suelo agrícola con glifosato en la cual se observó una degradación microbiana de este herbicida, pero no fue posible el crecimiento *in vitro* y la observación de colonias visibles en el laboratorio, lo que sugiere que la degradación primaria de este herbicida podría realizarse a través de microorganismos no cultivables.

En la muestra de suelo de Puerto Quito no existió una gran biodiversidad de microorganismos en comparación con las otras muestras, al considerar la diversidad de las UFC/mL a una dilución de  $10^{-6}$  mediante un análisis de turbidez de escala McFarland. Así, en Puerto Quito, la carga microbiana fue de  $6 \cdot 10^8$  UFC/mL,

correspondiente a uno en la escala de McFarland, mientras que en Otavalo y Pintag fue de  $8 \times 10^8$  UFC/mL, indicando una escala de 2 de McFarland.

En los suelos de climas tropicales, como es el caso de la muestra de Puerto Quito, con un clima típico de bosque lluvioso tropical y cuyas temperaturas oscilan entre 27 a 30 °C, la materia orgánica se descompone rápidamente, lixiviándose los nutrientes de la superficie y disminuyendo la disponibilidad de estos nutrientes para la microbiota (Madigan & Martinko, 2009), aislándose apenas dos microorganismos. Otra razón por la cual no existió una gran biodiversidad se debió al impacto adverso que el glifosato ocasiona en el microbioma del suelo, reduciendo su desarrollo fisiológico y bioquímico al alterar su metabolismo (Abad, 2017).

#### **Tabla 4.**

Caracterización macroscópica de los microorganismos degradadores de glifosato

<b>Código</b>	<b>Elevación</b>	<b>Margen</b>	<b>Forma</b>	<b>Color</b>	<b>Textura</b>
PG54P01	Convexa	Lobado	Irregular	Blanco	Creмоса
PG54P02	Plano	Liso	Redondo	Blanco	Creмоса
PG54P03	Plano	Liso	Redondo	Beige	Seco
PG54P04	Plano	Liso	Redondo	Amarillo tenue	Creмосо
PG54PQ01	Plana	Lobada	Irregular	Blanco	Creмоса
PG54PQ02	Convexa	Irregular	Redondo	Blanco	Seco
PG54T01	Plana	Liso	Redondo	Beige	Creмоса
PG54T02	Plana	Rizoide	Rizoide	Amarilla	Seco
PG54T03	Plana	Liso	Redondo	Beige	Seca
PG54T04	Plana	Irregular	Redondo	Blanco	Creмоса

**Elaborado por:** Los autores (2019)

En el caso de Otavalo y Pintag, la carga microbiana fue más diversa, debido a una mayor cantidad de cepas aisladas en comparación con la muestra de suelo de Puerto

Quito, como se evidencia en la tabla 4, presentando una diversidad funcional de estas comunidades microbianas resistentes al herbicida.

La caracterización macroscópica determinó diferencia en elevación, margen, forma, color y textura de las 10 cepas bacterianas aisladas, como se muestra en la tabla 4, permitiendo identificar diversidad microbiana resistente a una concentración determinada de glifosato, en cultivos mezclados.

**Tabla 5.**

Caracterización microscópica de los microorganismos biodegradadores de glifosato

Código	Catalasa	Oxidasa	Indol	Tinción Gram	Tinción esporas
PG54P01	+	-	-	+	+
PG54P02	+	-	-	+	+
PG54P03	+	-	-	-	-
PG54P04	+	+	-	-	-
PG54PQ01	-	-	-	-	-
PG54PQ02	-	-	-	-	-
PG54T01	+	-	-	-	-
PG54T02	+	-	-	-	-
PG54T03	-	-	-	+	+
PG54T04	-	-	-	-	-

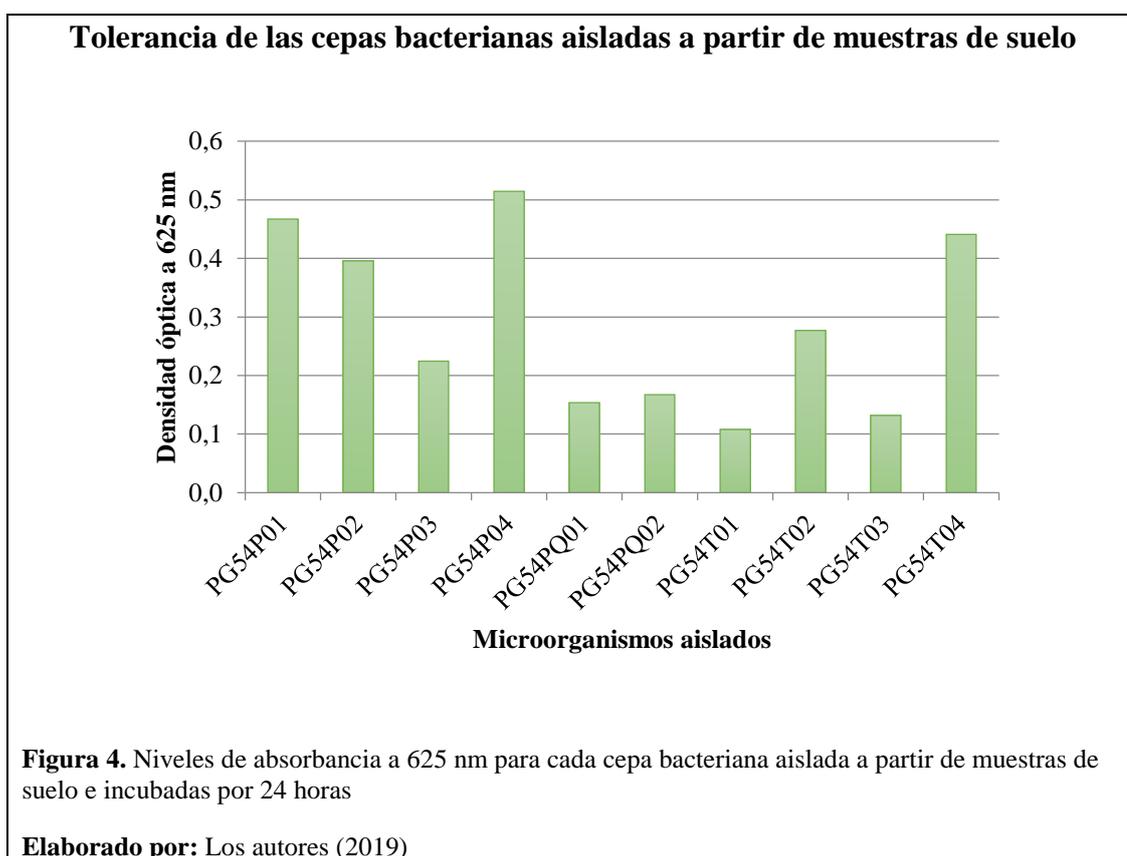
**Elaborado por:** Los autores (2019)

Durante el proceso de caracterización microscópica, la tinción Gram y la tinción de esporas, así como las pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa e indol) indicaron las características metabólicas de las cepas aisladas. En relación a los resultados obtenidos, se eligieron pruebas secuenciales para obtener una fiabilidad de la

caracterización del género y de la especie microbiana. Los resultados de la caracterización microscópica se muestran en la tabla 5.

### 3.3. Pre-selección de microorganismos tolerantes a glifosato

Mediante espectrofotometría UV-Vis, se determinó que las mejores bacterias tolerantes a glifosato, en relación a su crecimiento, fueron las cepas PG54P01, PG54P04 y PG54T04, debido a los altos valores de absorbancia en comparación a las demás, como se muestra en la figura 4, lo que indica una mayor cantidad de masa microbiana; consecuentemente, estas cepas fueron utilizadas para ensayos posteriores determinados en los siguientes apartados.



En esta investigación se utilizó agua peptonada bufferada para evitar cambios bruscos de pH ya que, se debe considerar que el incremento de glifosato provoca una acidificación del medio de cultivo dificultando el crecimiento bacteriano. Además de

la toxicidad del glifosato, es necesario considerar que el surfactante utilizado, Polioxietilamida (POEA), es un compuesto más tóxico que el herbicida, por lo que es importante aislar cepas capaces de tolerar este surfactante, así como el glifosato ya que, de esto depende la capacidad de degradación tanto *ex situ* como *in situ* (Schneider, Carmo, Takaki, Stuelp, & Ribeiro, 2014).

### **3.4. Identificación bioquímica de cepas tolerantes a glifosato**

La identificación de las cepas se dio gracias a la habilidad de los microorganismos para reaccionar a diferentes sustratos que contienen colorantes, produciendo un viraje (positivo) o permaneciendo intacto (negativo), de acuerdo a su metabolismo.

En base a los resultados del perfil bioquímico obtenido y con ayuda del software Crystal Mind, se determinó que las cepas Gram negativas, PG54P04 se trata de *Burkholderia cepacia* con un porcentaje de confianza del 99,74 % (veáse Anexo 6) y PG54T04 obtuvo un porcentaje de confianza de 97,61 %, con similitud para *Escherichia coli* (veáse Anexo 7).

El género *Burkholderia sp.* pertenece a la familia Burkholderiaceae y se encuentra comúnmente en suelos agrícolas y las rizósferas ya que, se ha determinado que puede formar simbiosis con plantas (Rojas, y otros, 2019) y es uno de los géneros más aislados en estudios de bacterias degradadoras de glifosato y de pesticidas, entre los que destacan las especies *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia multivorans* y *Burkholderia vietnamiensis* (Manogaran, Shukor, Yasid, Johari, & Ahmad, 2017).

En la investigación de Shahid & Khan (2018), se aislaron del suelo a cepas tolerantes a glifosato de cultivos de *Vicia faba* y se identificó a *Burkholderia cepacia* como la bacteria más resistente al herbicida, tolerando una concentración de glifosato de 3200

µg/mL e incluso, se comprobó su influencia en la disminución de la fitotoxicidad en el cultivo y en la producción de reguladores de fitocrecimiento. De esta manera, se determinó que *Burkholderia cepacia* puede servir como biofertilizante para mejorar la producción de garbanzos en suelos contaminados incluso con herbicidas.

El género de *Escherichia* pertenece a la familia Enterobacteriaceae. *Escherichia coli* es una bacteria cosmopolita y es utilizada como modelo para estudios genómicos y enzimológicos. Es de especial interés en biorremediación de glifosato ya que esta bacteria produce la enzima 5-enolpiruvilshikimato-fosfato sintetasa (EPSPS) similar al de las plantas. Estudios sobre mutaciones genéticas indican que mutaciones en el aminoácido prolina 101 (Pro<sup>101</sup>) de la enzima EPSPS confieren la tolerancia al herbicida, esta mutación puede servir para procesos de mejoramiento genético en plantas (Healy, Funke, Priestman, Han, & Schonbrun, 2007).

Para la cepa PG54P01 se requieren realizar pruebas más específicas para su identificación a nivel de género y especie (*véase Anexo 6*); sin embargo, se observó su crecimiento tanto en medio Manitol Agar Salado, el cual es utilizado sólo para el crecimiento de bacterias Gram positivas (Madigan, Martinko, & Brock, 2009), como en medio de cultivo con cloranfenicol (antibiótico comúnmente utilizado para inhibir crecimiento bacteriano), por lo que se confirma a través de estos medios selectivos que la cepa PG54P01 se trata de una bacteria Gram positiva.

### **3.5. Determinación de la tolerancia de los microorganismos a glifosato mediante microdilución en caldo**

#### **3.5.1. Evaluación cualitativa**

Para la evaluación cualitativa de la tolerancia de los microorganismos a distintas concentraciones de glifosato, se determinó el crecimiento microbiano, mediante la

coloración de los pocillos, tras adicionar el colorante TTC, a una concentración de 1 %, el cual es un indicador de la respiración celular y su visualización de viraje se observa en poco tiempo. El compuesto se torna de color rojo en presencia de enzimas deshidrogenasas, mientras que permanece incoloro en ausencia de dichas enzimas, debido a que han sido desnaturalizadas o degradadas (Balouiri, Sadiki, & Ibsouda, 2016).

La coloración de los pocillos en la placa fue distinta para cada cepa bacteriana aislada, incluyendo el control positivo (*Micrococcus yunnanensis* ATCC 7468), considerando además que, el control de esterilidad no presentó coloración, lo cual indicó la ausencia de contaminación en el ensayo. Para la cepa PG54P01, se observó una coloración tenue a una concentración de 0,2 % (v/v) (fila G) de glifosato comercial, en las tres repeticiones; mientras que, para la cepa PG54P04, la coloración fue intensa a una concentración de 0,4 % (v/v) (fila F) de glifosato comercial para las tres repeticiones. En el caso de la cepa PG54T04, la coloración varió, siendo tenue a una concentración de 0,4 % (v/v) (fila E) de la primera y segunda repetición, pero intensa a partir de la concentración de 0,2 % (v/v) (fila G).

De esta manera, se determinó cualitativamente que la cepa PG54P04 tiene mayor crecimiento a una concentración más alta de glifosato (0,4 % v/v), por tanto, es más tolerante a concentraciones elevadas del xenobiótico que los dos inóculos bacterianos, seguida de la cepa PG54T04.

### **3.5.2. Evaluación cuantitativa mediante análisis estadístico**

Por otro lado, en el análisis cuantitativo mediante el equipo Microplate Reader, se determinó la absorbancia de cada pocillo de la placa la cual, a partir de la ecuación de la recta establecida mediante curvas de calibración de crecimiento en el apartado

2.6.5., permitió conocer la UFC/mL de cada inóculo microbiano, como se muestra en la tabla 6, unidad usada para el análisis estadístico ANOVA.

**Tabla 6.**

Lectura de Log UFC/mL obtenida a partir de la ecuación de la recta de cada cepa

Concentración de glifosato (%;v/v)/Bacteria	PG54P01			PG54P04			PG54T04		
	12,5	8,47	8,52	8,45	8,69	8,51	8,71	8,71	8,75
6,3	8,48	8,53	8,52	8,74	8,68	8,73	8,76	8,75	8,80
3,2	8,56	8,56	8,54	8,75	8,71	8,75	8,78	8,76	8,85
1,6	8,58	8,57	8,55	8,76	8,90	8,78	8,79	8,78	8,94
0,8	8,67	8,66	8,56	8,86	9,43	8,88	8,99	8,78	9,03
0,4	8,75	8,74	8,60	9,39	9,47	9,21	9,21	8,85	9,07
0,2	8,80	9,16	8,68	9,57	9,62	9,60	9,25	9,07	9,20
0,1	8,93	9,29	9,10	9,65	9,75	9,65	9,25	9,30	9,31

Elaborado por: Los autores (2019)

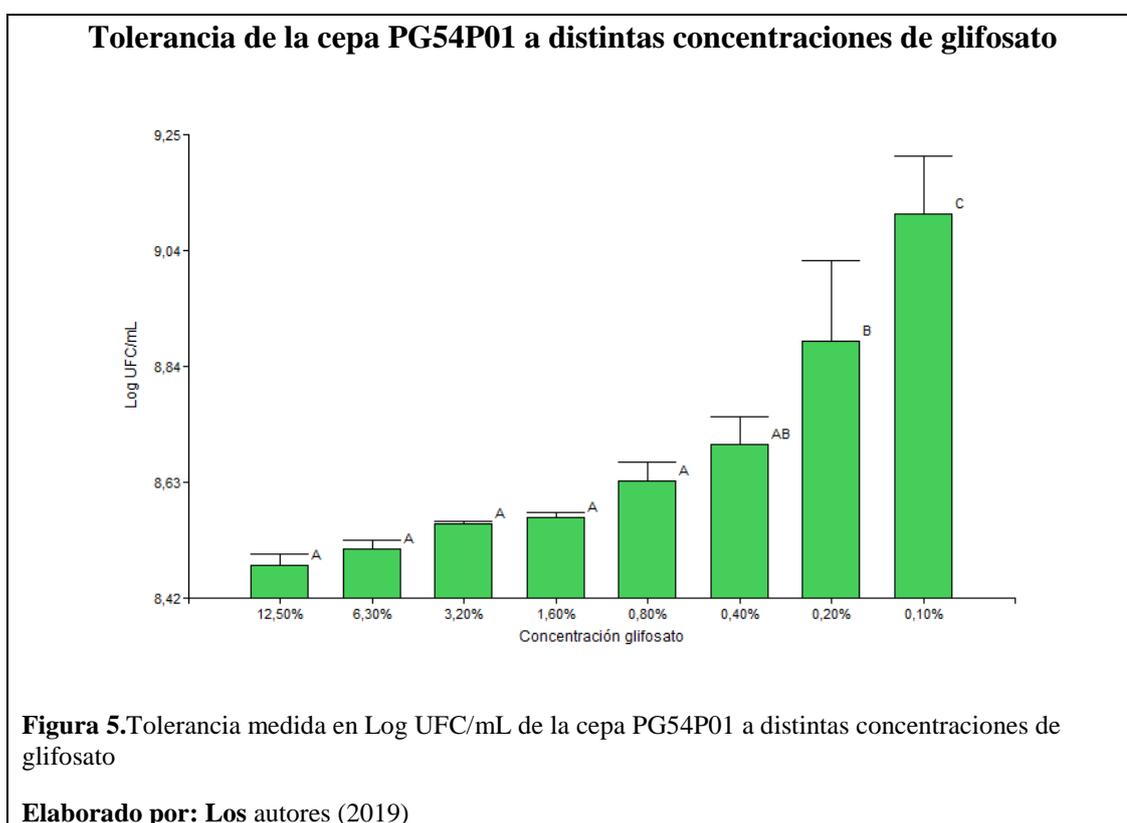
### 3.5.2.1. Tolerancia de la cepa PG54P01 a glifosato, mediante prueba

#### Duncan 5%

Los resultados obtenidos mediante ANOVA para la tolerancia de la cepa PG54P01 a concentraciones de glifosato, permitieron identificar la existencia de diferencia significativa en al menos una concentración, al considerar el p-valor (0,0001), el cual es menor a un  $\alpha=0,05$ .

Mediante la prueba Post Hoc Duncan 5 %, se identificaron 8 rangos de significancia de las 8 concentraciones de glifosato analizadas en la bacteria PG54P01, como se observa en la figura 5. Estos fueron: A, AB, B y C. El rango A de significancia abarca 5 concentraciones de glifosato utilizadas (12,50 % (v/v), 6,30 % (v/v), 3,20 % (v/v),

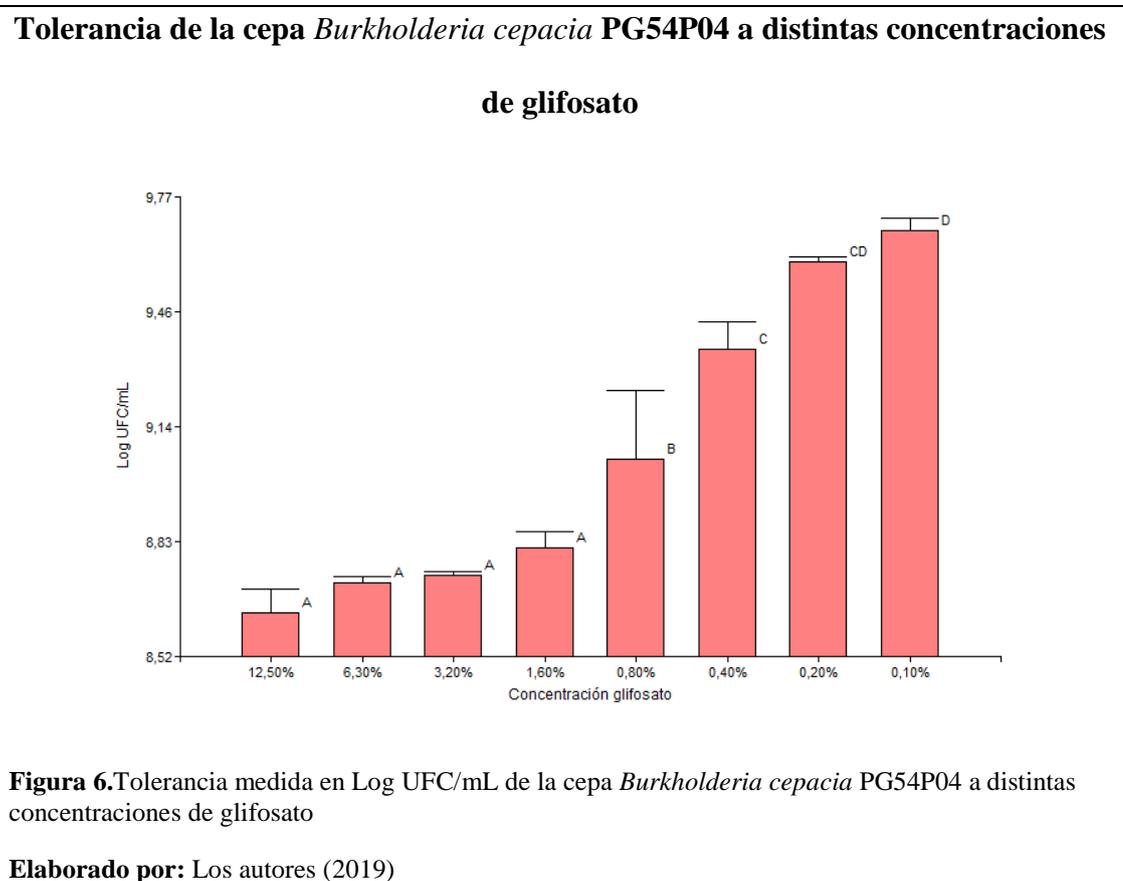
1,60 % (v/v) y 0,80 % (v/v)), en las cuales el crecimiento de la cepa bacteriana fue mínimo, en un intervalo de valores medios de Log UFC/mL que van de 8,48 a 8,63 Log UFC/mL. Los rangos AB, B y C con concentraciones de glifosato 0,40 % (v/v), 0,20 % (v/v) y 0,10 % (v/v), presentan los mayores valores de crecimiento microbiano, con 8,70, 8,88 y 9,30 Log UFC/mL, respectivamente, siendo mayor el crecimiento a partir de la concentración 0,40 % (v/v). Determinando así que, cuantitativamente, PG54P01 presentó mayor crecimiento y, por ende, tolerancia al glifosato a concentraciones bajas, de 0,40 % (v/v) a 0,10 % (v/v), siendo su tolerancia máxima a una concentración de 0,40 % (v/v).



### 3.5.2.2. Tolerancia de la cepa *Burkholderia cepacia* PG54P04 a glifosato, mediante prueba Duncan 5 %

Los resultados obtenidos mediante ANOVA para la tolerancia de la cepa *Burkholderia cepacia* PG54P04 a concentraciones de glifosato, permitieron identificar la existencia

de diferencia significativa en al menos una concentración, al considerar el p-valor ( $<0,0001$ ), el cual es menor a un  $\alpha=0,05$ .



Mediante la prueba Post Hoc Duncan 5 %, se identificaron 8 rangos de significancia de las 8 concentraciones de glifosato analizadas en la bacteria *Burkholderia cepacia* PG54P04, como se observa en la figura 6. Estos fueron: A, B, C, CD y D. El rango A de significancia abarca 4 concentraciones de glifosato utilizadas (12,50 % (v/v), 6,30 % (v/v), 3,20 % (v/v) y 1,60 % (v/v)), en las cuales el crecimiento de la cepa bacteriana fue mínimo a comparación de los otros resultados, en un intervalo de valores medios de Log UFC/mL que van de 8,64 a 8,81 Log UFC/mL. El rango B (0,80 % (v/v)) presentó un crecimiento menor a comparación de los rangos C, CD y D (0,40 % (v/v), 0,20 % (v/v) y 0,10% (v/v)) con un valor medio de Log UFC/mL de 9,06; mientras que los rangos C, CD y D presentan los mayores valores de crecimiento microbiano, con 9,36, 9,60 y 9,68 Log UFC/mL, respectivamente. De esta manera,

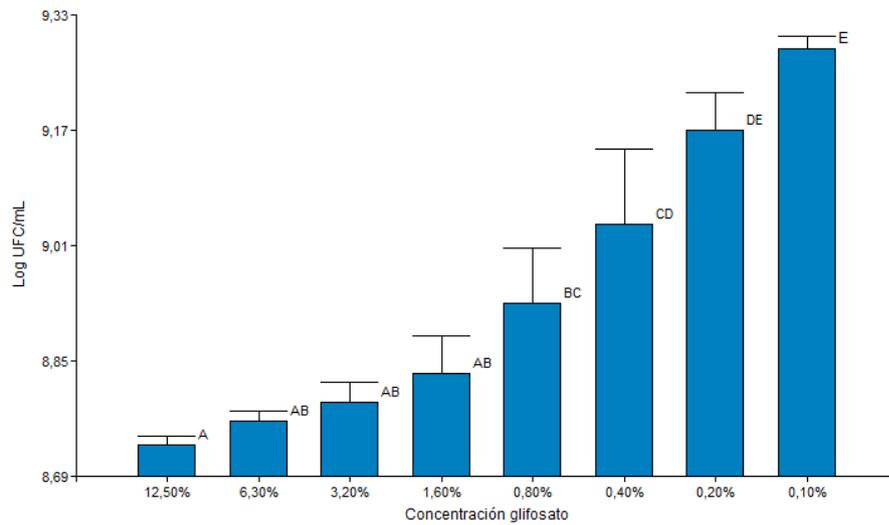
cuantitativamente, *Burkholderia cepacia* PG54P04 presentó mayor crecimiento y, por ende, tolerancia al glifosato a concentraciones bajas, de 0,80 % (v/v) a 0,10 % (v/v), siendo su tolerancia máxima a una concentración de 0,80 % (v/v).

### **3.5.2.3. Tolerancia de la cepa *Escherichia coli* PG54T04 a glifosato, mediante prueba Duncan 5 %**

Los resultados obtenidos mediante ANOVA para la tolerancia de la cepa *Escherichia coli* PG54T04 a concentraciones de glifosato, permitieron identificar la existencia de diferencia significativa en al menos una concentración, al considerar el p-valor ( $<0,0001$ ), el cual es menor a un  $\alpha=0,05$ .

Mediante la prueba Post Hoc Duncan 5 %, se identificaron 8 rangos de significancia de las 8 concentraciones de glifosato analizadas en la bacteria *Escherichia coli* PG54T04, como se observa en la figura 7. Estos fueron: A, AB, BC, CD y DE y E. El rango A de significancia abarca una concentración de glifosato utilizada (12,50 % (v/v)) con un valor medio de 8,74 Log UFC/mL, mientras que el rango AB engloba 3 concentraciones (6,30 % (v/v), 3,20 % (v/v) y 1,60 % (v/v)) en las cuales, el crecimiento de la cepa bacteriana fue mínimo a comparación de los otros resultados, en un intervalo de valores medios de Log UFC/mL que van de 8,77 a 8,84 Log UFC/mL. Desde el rango BC hasta el E (0,80 % (v/v) - 0,10 % (v/v)), fue mejor el crecimiento microbiano, debido a que los valores de Log UFC/mL fueron elevados en comparación a los valores de rangos anteriores, con un intervalo de crecimiento medio de 8,93 a 9,29 Log UFC/mL. De esta manera, cuantitativamente, *Escherichia coli* PG54T04 presentó mayor crecimiento y, por ende, tolerancia al glifosato a concentraciones bajas del xenobiótico, de 0,80 % (v/v) a 0,10 % (v/v) (v/v) siendo su tolerancia máxima a una concentración de 0,80 % (v/v).

**Tolerancia de la cepa *Escherichia coli* PG54T04 a distintas concentraciones de glifosato**



**Figura 7.** Tolerancia medida en Log UFC/mL de la cepa *Escherichia coli* PG54T04 a distintas concentraciones de glifosato

**Elaborado por:** Los autores (2019)

**3.5.2.4. Comparación entre la tolerancia de las cepas PG54P01,**

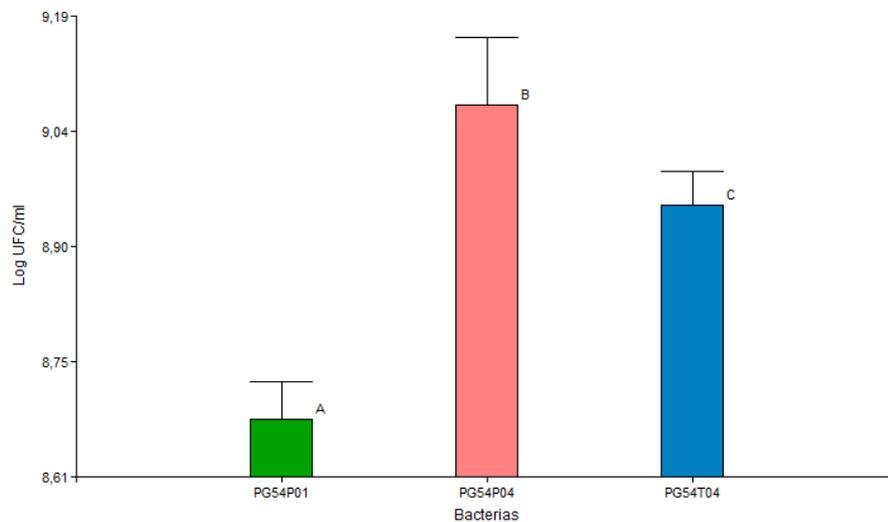
***Burkholderia cepacia* PG54P04 y *Escherichia coli* PG54T04**

Los resultados obtenidos mediante ANOVA y la prueba Post Hoc de Duncan 5 % para la tolerancia de las cepas bacterianas a concentraciones de glifosato, permitieron identificar la existencia de diferencia significativa entre las tres cepas, al considerar el p-valor ( $<0,0001$ ), el cual es menor a un  $\alpha=0,05$ .

Como se observa en la figura 8, *Burkholderia cepacia* PG54P04 presentó mayor crecimiento a distintas concentraciones de glifosato, con una media de Log UFC/mL de 9,07, seguido por *Escherichia coli* PG54T04, con una media de crecimiento de 8,95 Log UFC/mL, siendo la cepa PG54P01 la que presentó menor crecimiento entre las tres bacterias, con 8,68 Log UFC/mL.

**Comparación entre la tolerancia de las cepas PG54P01, *Burkholderia cepacia***

**PG54P04 y *Escherichia coli* PG54T04**



**Figura 8.** Comparación entre la tolerancia Log UFC/mL de las tres cepas aisladas

**Elaborado:** Por los autores (2019)

El crecimiento de *Burkholderia cepacia* en presencia de pesticidas organofosforados se debe a su versatilidad metabólica para utilizar ácidos grasos, azúcares, ácidos dicarboxílicos, alcoholes, compuestos aromáticos, aminoácidos y aminas (Fernández & Verduga, 2014), como fuente de nutrientes y energía para su crecimiento, presentando una gran ventaja respecto a otras bacterias, debido a su complejo enzimático Metil Paration Hidrolasa (MPH), el cual es capaz de degradar este tipo de pesticidas a partir de la escisión del enlace C-P (Ekkhunnatham, Jongsareejit, Yamkunthong, & Wichitwechkarn, 2012). En cuanto a *Escherichia coli*, su crecimiento en presencia de estos pesticidas se debe a la enzima C-P liasa, capaz de cortar los enlaces C-P de organofosforados y alquil-fosfonatos (Seweryn, y otros, 2015), usando, como fuente de nutrientes para su desarrollo, los subproductos de la degradación microbiana. Para el caso de PG54P01, su bajo crecimiento respecto a las otras cepas se debe a un efecto tóxico de la concentración de glifosato sobre su

actividad metabólica, alterando su desarrollo bioquímico y fisiológico (Ortiz-Hernández, Sánchez-Salinas, Castrejón, Dantan, & Popoca, 2013).

### 3.6. Análisis de la capacidad biodegradadora de glifosato mediante

#### cromatografía en capa fina (TLC)

Considerando la polaridad de la molécula de glifosato y su carácter hidrofílico, la elección de una fase móvil con una mezcla de solventes polares (etanol(5)/agua(3)/acetato de etilo(2) v/v) se basó en tres criterios: solubilidad, afinidad y resolución de las moléculas de interés (Cai, 2012), los cuales también intervinieron en la selección de la fase móvil de la investigación realizada por Kastelan-Macan, Macan, Zelenika, & Babic (2005).

#### Tabla 7.

Análisis cromatográfico de la biodegradación de glifosato a los 5 días de inoculación bacteriana

N° de mancha	Estándar de glifosato comercial	Cepa PG54P01	Cepa PG54P04	Cepa PG54O04
1	0,26	0,54	0,56	0,58
2	-	0,65	0,65	0,65
3	-	0,79	0,78	0,80
4	-	0,91	0,94	0,93

**Elaborado por:** Los autores (2019)

En la TLC realizada con las muestras extraídas luego de 5 días de incubación de los microorganismos con glifosato, se identificaron cuatro manchas por cada muestra (véase Anexo 9) con su *Rf* respectivo, como se muestra en la tabla 7. A partir de estos valores, y considerando el *Rf* del estándar comercial de glifosato (0,26), se evidenció biodegradación del xenobiótico por parte de los microorganismos aislados, con

estructura química desconocida, pero con similitud en el *Rf* de 0,65 entre las tres bacterias.

En la TLC realizada con las muestras extraídas luego de 15 días de incubación de los microorganismos con glifosato, se identificaron dos manchas por cada muestra (*véase Anexo 10*) con su *Rf* respectivo, como se muestra en la tabla 8. A partir de estos valores, y considerando el *Rf* del estándar comercial de glifosato (0,26), se determinó una biodegradación del xenobiótico por parte de los microorganismos, existiendo moléculas de estructura química desconocida, pero similares al considerar el *Rf* de 0,71, el cual fue el mismo para las tres bacterias. Además, se identificó gran similitud entre los valores *Rf* de las cepas PG54P04 y PG54P01.

**Tabla 8.**

Análisis cromatográfico de la biodegradación de glifosato a los 15 días de inoculación bacteriana

N° de mancha	Estándar de glifosato comercial	Cepa PG54P01	Cepa PG54P04	Cepa PG54T04
1	0,26	0,50	0,50	0,39
2	-	0,71	0,71	0,71

**Elaborado por:** Los autores (2019)

De esta manera, con los valores *Rf* de ambas etapas del ensayo, se determinó diferencia en la biodegradación de glifosato por tiempo de inoculación, existiendo mayor número de moléculas generadas a partir de los 5 días que a los 15 días de ensayo. Esta diferencia se explica al considerar el metabolismo de pesticidas (Ortiz-Hernández, Sánchez-Salinas, Castrejón, Dantan, & Popoca, 2013) y la cinética de crecimiento bacteriano, donde la fase logarítmica se caracteriza por la duplicación celular por el consumo del sustrato por parte del microorganismo, mientras que, en la fase

estacionaria, el crecimiento se compensa con la mortalidad celular, debido al agotamiento de sustrato o nutrientes necesarios para el desarrollo (Madigan, Martinko, & Brock, 2009).

Así, durante los 5 días de ensayo (fase logarítmica), las bacterias aisladas a partir del suelo metabolizaron el glifosato, usándolo como recurso de carbono, fósforo, nitrógeno y energía (Ekkhunnatham, Jongsareejit, Yamkunthong, & Wichitwechkarn, 2012), mediante reacciones de hidrólisis y de óxido-reducción (Zhan, Feng, Fan, & Chen, 2018), características de la fase I de metabolismo de pesticidas, como lo indica Ortiz-Hernández, Sánchez-Salinas, Castrejón, Dantan, & Popoca (2013) en su investigación; mientras que, a los 15 días (fase estacionaria), al agotarse los nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano, el metabolismo celular disminuyó y con ello, inició la fase II de metabolismo de pesticidas, generándose la conjugación de los metabolitos generados a los 5 días a un azúcar o aminoácido, incrementando su solubilidad y reduciendo su toxicidad (Ortiz-Hernández, Sánchez-Salinas, Castrejón, Dantan, & Popoca, 2013).

Por otra parte, según Islas (2013), el revelador ninhidrina (hidrato de tricetohidrineno) reacciona con grupos amino libre ( $-NH_2$ ) de aminoácidos, dando lugar a la formación de amoníaco ( $NH_3$ ) y  $CO_2$ , con reducción del reactivo a hidrindantina, la cual a su vez reacciona con  $NH_3$  para generar un compuesto de adición doble de coloración azul-púrpura. El glifosato posee un grupo amino secundario en su estructura, el cual, dependiendo de la ruta de degradación microbiana, formará parte de compuestos como sarcosina y el aminoácido glicina (ruta C-P liasa), que poseen grupos amino secundarios y libres (Sviridov A. , Shushkova, Ermakova, Ivanova, & Leontievsky, 2014), respectivamente, así como de AMPA (ruta AMPA y glioxilato), el cual posee un grupo amino primario (Zhan, Feng, Fan, & Chen, 2018).

Por ello, la TLC de ambos periodos de tiempo se observó una coloración azul-púrpura en las manchas de las muestras generadas durante el ensayo cromatográfico, evidenciando productos de degradación microbiana con grupos amino en su estructura, los cuales, además, son retenidos por la fase estacionaria de sílica gel, la cual posee un carácter ligeramente polar y una alta afinidad por dichos grupos amino, al estar formada por grupos silano y siloxano (Cai, 2012; Coskun, 2016).

## Conclusiones

Las zonas de cultivo de Pintag y Otavalo, rociadas periódicamente con glifosato, fueron los sitios apropiados para el aislamiento de microorganismos resistentes a este herbicida a partir del suelo, debido al crecimiento que estos presentaron, incorporando nutrientes como carbono, nitrógeno, fósforo y energía en su metabolismo.

La caracterización de los diez microorganismos aislados estableció diferencias entre la microbiota resistente a glifosato en el suelo, existiendo diversidad tanto a nivel macroscópico, en cuanto a elevación, margen, forma, color y textura, así como a nivel microscópico, con características metabólicas propias, determinadas mediante tinción Gram, tinción de esporas y pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa e indol).

Las cepas tolerantes a una concentración alta de glifosato 1 % (v/v), en un tiempo de incubación de 5 días, fueron PG54P01, PG54P04 y PG54T04. Mediante sistemas miniaturizados API, se identificó a PG54P04 como *Burkholderia cepacia*, con 99,74 % de confianza y, a PG54T04 como *Escherichia coli*, con 97,61 % de confianza, mientras que, para PG54P01 se necesita realizar pruebas más específicas para su identificación a nivel de género y especie.

En la determinación de la tolerancia de PG54P01, *Burkholderia cepacia* PG54P04 y *Escherichia coli* PG54T04 a glifosato, mediante análisis estadístico, se estableció que PG54P01 tiene una tolerancia máxima a una concentración de 0,40 % (v/v) del

herbicida, mientras que, la tolerancia máxima tanto para *Burkholderia cepacia* PG54P04 como para *Escherichia coli* PG54T04 fue de 0,80 % (v/v). De las tres cepas, *Burkholderia cepacia* PG54P04 presentó mayor tolerancia a distintas concentraciones de glifosato, seguido de *Escherichia coli* PG54T04, siendo PG54P01 la menos tolerante, siendo importante su utilidad como microorganismo biorremediador de suelos contaminados con glifosato.

Mediante TLC se determinó la capacidad de biodegradación de glifosato por las cepas PG54P01, *Burkholderia cepacia* PG54P04 y *Escherichia coli* PG54T04, a los 5 días del ensayo, observándose cuatro manchas por cada muestra de los microorganismos y la ausencia de un *R<sub>f</sub>* del estándar comercial, evidenciando la completa biodegradación del xenobiótico. Por otra parte, en la TLC realizada a los 15 días del ensayo se identificaron sólo dos manchas por cada muestra, existiendo una completa y mayor biodegradación del glifosato al reducir el número de productos intermediarios.

Finalmente, los productos de la degradación de las cepas PG54P01, *Burkholderia cepacia* PG54P04 y *Escherichia coli* PG54T04 presentaron grupos amino en su estructura, los cuales se tiñeron al contacto con el revelador nihindrina, indicando una posible similitud entre dichos productos, debido a una misma ruta metabólica (ruta C-P liasa) presente en las tres cepas.

## Recomendaciones

Realizar investigaciones con las cepas aisladas de suelo degradadoras de glifosato para su utilización en biorremediación *in situ* de suelos contaminados con glifosato y otros pesticidas organofosforados.

Usar técnicas de biología molecular para la identificación de la cepa PG54P01, como técnicas de secuenciación de ADN y utilización de base de datos de genomas para tener mayor certeza de su género y especie.

Realizar la extracción del glifosato y sus derivados a través de mezcla de otros solventes orgánicos más económicos como ácido acético, aceto-nitrilo, metanol y teniendo en cuenta las características químicas del glifosato, especialmente su polaridad y su inestabilidad térmica.

Utilizar un estándar de glifosato con alto grado de pureza para realizar un análisis de Cromatografía de Gases acoplado a masas GC/MS a través de una derivatización, pudiendo identificar las estructuras químicas de la biodegradación de glifosato utilizando las cepas aisladas en esta investigación.

## Referencias

- Abad, Y. (2017). *Caracterización, identificación y evaluación de microorganismos autóctonos biorremediadores de suelos contaminados por agroquímicos en la provincia de Loja*. Tesis de maestría, Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cuenca.
- Agboola, A., Ekundayo, F., Ekundayo, E., Fasoro, A., Ayantola, K., & Kayode, A. (2018). Influence of glyphosate on rhizosphere microorganisms and their ability to solubilise phosphate. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND ANTIMICROBIAL AGENTS*, 4(2), 15-21.
- Aguilar, W., Arce, P., Galiano, F., & Torres, T. (2016). Aislamiento de esporas y evaluación de métodos de inoculación en la producción de micorrizas en cultivos trampa. *Revista Tecnología en Marcha*, 5-14.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. A review . *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79.
- Benavides, A. (Octubre de 2007). *Propuesta de Guía de aplicación de técnicas de microbiología (Bacterias y hongos) para ser utilizado en microbiología general*. Recuperado el 23 de Marzo de 2019, de Universidad de El Salvador: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/4768/1/16100029.pdf?fbclid=IwAR1sImG0RGPyejPf4raemgcBMTzs8-IxSr06pZVrwRqVcq0u9Y4xTzJ4Pa4>
- Bhalerao, T. S., & Puranik, P. (2007). Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*. *International Biodeterioration & biodegradation*, 59(4), 315-321.

- Bustos, M. (2012). *Destino ambiental del glifosato en una zona arroceras del Tolima, Colombia*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Cai, L. (2012). Thin Layer Chromatography. En S. Gallagher, & E. Wiley, *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* (Segunda ed., págs. 6.3.1-6.3.18). Wiley-Blackwell.
- Carlone, N., & Pompei, R. (2013). *Microbiologia Farmaceutica* (Segunda ed.). Napoli: EdiSES s.r.l.
- Céspedes, G. (2012). *Predicción del comportamiento de Escherichia coli en leche cruda al elevar la temperatura hasta la pasteurización aplicando microbiología predictiva*. Tesis de grado, Universidad Tecnológica Equinoccial, Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Quito.
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul*, III(2), 156-160.
- Duke, S., & Powles, S. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. . *Pest Management Science*, 64(3), 319-325.
- Ekkhunnatham, A., Jongsareejit, B., Yamkunthong, W., & Wichitwechkarn, J. (2012). Purification and characterization of methyl parathion hydrolase from Burkholderia cepacia capable of degrading organophosphate insecticides. *World J Microbiol Biotechnol*, IV(28), 1739-1746.
- Ermakova, I., Kiseleva, N., Shushkova, T., Zharikov, M., Zharikov, G., & Leontievsky, A. (2010). Bioremediation of glyphosate-contaminated soil. *Appl Microbiol Biotechnol*, 88, 585-594. doi:10.1007/s00253-010-2775-0

- Fernández, E., & Verduga, L. (2014). *Evaluación de la eficiencia de biorremediación de efluentes de curtiembres en tanques sedimentadores artesanales del proceso de pelambre mediante aislamiento de bacterias remediadoras; estudio de caso: taller artesanal en Barrio Totoras, Cantón Ambato*. Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ingeniería en Geología, Minas, Petróleos y Ambiental, Quito.
- Firdous, S. (2017). *Molecular Characterization of Glyphosate Degrading and/or Resistant Bacterial Strains*. Tesis doctoral, Pakistan Institute of Engineering and Applied Science, Department of Biotechnology, Nilore.
- Forlani, G., Mangiagalli, A., Nielsen, E., & Suardi, C. (1999). Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 991-997.
- Fuerst, J. (2014). Microorganisms—A Journal and a Unifying Concept for the Science of Microbiology. *Microorganisms*, 2, 140-146.
- Gamazo, C., López-Goñi, I., & Díaz, R. (2005). *Manual Práctico de Microbiología*. Barcelona, España: Masson.S.A.
- Gimsing, A., & Borggard, O. (2002). Competitive adsorption and desorption of glyphosate and phosphate on clay silicates and oxides. *Clay Minerals*, 37, 509-515.
- Guerrero, G. (2013). *DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO Y ÁCIDO AMINOMETILFOSFÓNICO EN SUELOS MEDIANTE HPLC CON DERIVATIZACIÓN PRE-COLUMNA*. Tesis de pregrado, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Hidalgo, México.

- Guzmán, D. (2018). *Análisis químico del antibiótico producido por Bacillus megaterium aislado de muestras de suelo, mediante cromatografía y técnicas espectroscópicas*. Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana, Facultad de Ciencias de la Vida, Quito.
- Handelsman, J., Rondon, M., Brady, S., Clardy, S., & Goodman, R. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown 05SP 09 soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5(10), R245-R249.
- Healy, M., Funke, T., Priestman, M., Han, H., & Schonbrun, E. (2007). Structural Basis of Glyphosate Tolerance Resulting from Mutations of Pro101 in Escherichia coli 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase\*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(45), 32949–32955.
- INEN. (01 de 2014). *Calidad del Suelo. Muestreo. Parte 4: Guía de procedimiento para la investigación de sitios naturales, casi naturales y cultivados. (Primera ). (I. E. Normalización, Ed.)* Quito, Ecuador.
- Islas, G. (2013). *Determinación de glifosato y ácido aminometilfosfónico en suelos mediante HPLC con derivatización pre-columna*. Tesis de pregrado, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Pachuca de Soto.
- Kastelan-Macan, M., Macan, J., Zelenika, A., & Babic, S. (2005). Ultrasonic Extraction and TLC Determination of Glyphosate in the Spiked Red Soils. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 70(3), 99-103.
- Leboffe, M., & Pierce, B. (2011). *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory*. Englewood, Estados Unidos: Morton Publishing.

- Liu, C., McLean, P., Sookdeo, C., & Cannon, F. (junio de 1991). Degradation of the Herbicide Glyphosate by Members of the Family Rhizobiaceae. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1799-1804.
- Lobos, T. (2017). Gram. Más que un método de tinción. *ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas*, 18(1), 63-66.
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G., & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*, 3(1), 10-18.
- Lundanes, E., Reubsæet, L., & Greibrokk, T. (2014). *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Madigan, M., Martinko, J., & Brock, E. (2009). *Biología de los Microorganismos* (12va ed.). Barcelona: Prentice Hall-Pearson Education.
- Madsen, E. (2016). *Environmental microbiology: from genomes to biogeochemistry*. Singapore, Singapore: John Wiley & Sons, Inc.
- Manogaran, M., Shukor, M., Yasid, N., Johari, W., & Ahmad, S. (2017). Isolation and characterisation of glyphosate-degrading bacteria isolated from local soils in Malaysia. *Rendiconti Lincei*, 28(3), 471-479.
- Nardo, D., Evia, G., Castiglioni, E., Egaña, E., Galiotta, G., Laporta, M., & Núñez, M. (2015). Determinación de glifosato mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) en el paisaje protegido Laguna de Rocha y su entorno, Uruguay. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*, 64(10), 64-70.

- Ortiz-Hernández, M., Sánchez-Salinas, E., Castrejón, M., Dantan, E., & Popoca, E. (2013). Mechanisms and strategies for pesticide biodegradation: Opportunity for waste, soils and water cleaning. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 85-104.
- Pachón, D. (2009). *Aislamiento, identificación y serotipificación de enterobacterias del género Salmonella en una población de Crocodylus intermedius y testudinos mantenidos en cautiverio en la Estación Biológica Tropical Roberto Franco E.B.T.R.B.* Tesis de Grado, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas, Bogotá.
- Pimenta, T., Santana, M., Días, A., Oliveira, F., Henrique, P., & Paulino de Pinho, G. (2013). Study of the Reaction Derivatization Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) with N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. *American Journal of Analytical Chemistry*, 4, 647-652. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2013.411077>
- Polo, L. (2015). *Fundamentos de cromatografía*. Madrid: DEXTRA Editorial S.L.
- Rocha, F., & Teixeira, L. (2004). Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis . *Quimica Nova*, 27(5), 807-812.
- Rojas, F., López, D., Meza, G., Mendez, A., Ibarra, A., & Estrada, P. (2019). El controvertido complejo Burkholderia cepacia, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(1), 84-92.
- Ruiz, A. (2012). *EFEECTO Y PERSISTENCIA DEL GLIFOSATO SOBRE PARÁMETROS BIOLÓGICOS DEL SUELO EN BOSQUE SECUNDARIO*,

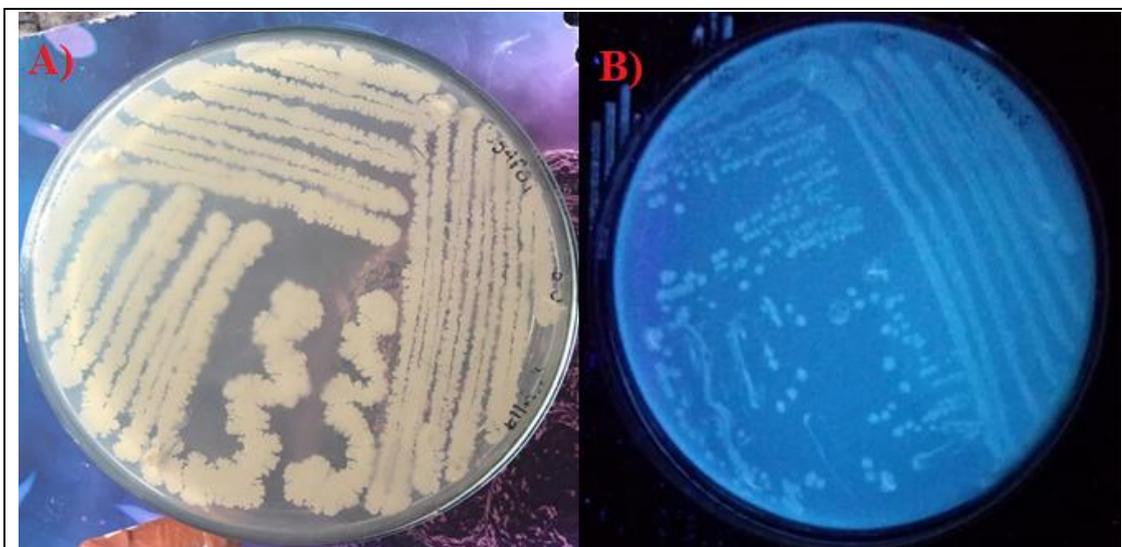
*EN SUCUMBÍOS*. Tesis de Grado, Universidad Técnica Del Norte, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Ibarra.

- Schimpf, M., Milesi, M. M., Ingaramo, P. L., & Varayoud, J. (2017). Neonatal exposure to a glyphosate based herbicide alters the development of the rat uterus. *Toxicology*, 376, 2-14.
- Schneider, I., Carmo, N., Takaki, R., Stuelp, P., & Ribeiro, E. (2014). Influence of glyphosate in planktonic and biofilm growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 971-875.
- Seweryn, P., Bich Van, L., Kjeldgaard, M., Russo, C., Passmore, L., Hove-Jensen, B., . . . Brodersen, D. (2015). Structural insights into the bacterial carbon-phosphorus lyase machinery. *Nature*, 68-72.
- Shahid, M., & Khan, M. (2018). Glyphosate induced toxicity to chickpea plants and stress alleviation by herbicide tolerant phosphate solubilizing *Burkholderia cepacia* PSBB1 carrying multifarious plant growth promoting activities. *Biotechnology*, 8(2), 131.
- Singh, B., & Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 428-471.
- Spangenberg, B., Poole, C., & Weins, C. (2011). Quantitative thin-layer chromatography: A practical survey. . *Quantitative Thin-layer Cromatography*, 7, 23-29.
- Striegel, M., & Hill, J. (1996). Thin-Layer Chromatography for binding Media analysis . *Scientific Tools for Conservations*, 2, 1-174.

- Suheil, F., & Fehmey, A. (2009). Determination of minimum inhibitory concentration from chemical pesticides on bacteria *Azotobacter* number with period of incubation different. *Diyala Agricultural Sciences Journal*, 1(1), 199-212.
- Sviridov, A., Shushkova, t., Ermakova, I., Ivanova, E., & Leontievsky, A. (2014). Glyphosate: Safety Risks, Biodegradation, and Bioremediation. *Current Environmental Issues and Challenges*, 183-195. doi:v
- Sviridov, A., Shushkova, T., Ermakova, I., Ivanova, E., Epiktetov, D., & Leontlevsky. (2015). Microbial Degradation of Glyphosate Herbicides (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(2), 188-195.
- Van Bruggen, A., He, M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K., Finckh, M., & J, M. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment*, 255-268.
- Zhan, H., Feng, Y., Fan, X., & Chen, S. (2018). Recent advances in glyphosate biodegradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(12), 5033-5043.
- Zhao, H., Tao, K., Zhu, J., Liu, S., Gao, H., & Zhou, X. (2015). Bioremediation potential of glyphosate-degrading *Pseudomonas* spp. strains isolated from contaminated soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.* , 165-170.

## Anexos

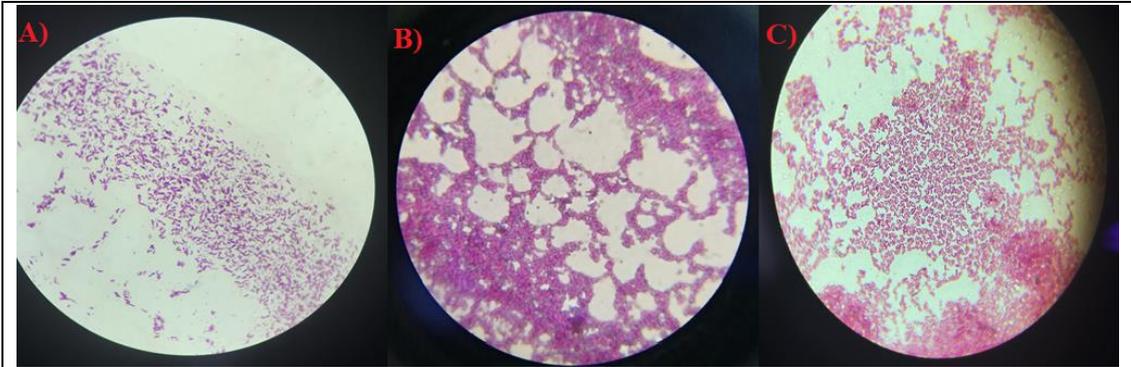
**Anexo 1.** PG54P01 y *Burkholderia cepacia* PG54P04 inoculadas en distintos medios selectivos



**Nota:** A) PG54P01 aislada en medio Agar Nutriente; B) *Burkholderia cepacia* PG54P04 aislada en Agar Cetrimida visto bajo luz ultravioleta a 365 nm.

**Elaborado por:** Los autores (2019)

**Anexo 2.** Tinción Gram de las cepas PG54P01, *Burkholderia cepacia* PG54P04 y *Escherichia coli* PG54T04



**Nota:** A) Tinción Gram PG54P01; B) Tinción Gram *Burkholderia cepacia* PG54P04; C) Tinción Gram *Escherichia coli* PG54T04.

**Elaborado por:** Los autores (2019)

**Anexo 3.** Prueba para identificación bioquímica (API) de las cepas *Burkholderia cepacia* PG54P04 y *Escherichia coli* PG54T04



**Nota:** A) Prueba API *Burkholderia cepacia* PG54P04; B) Prueba API *Escherichia coli* PG54T04.

**Elaborado por:** Los autores (2019)

**Anexo 4.** Identificación bioquímica de *Burkholderia cepacia* PG54P04, mediante el software CrystalMind

	<u>Validez del biotipo</u>	<u>Confianza</u>
<b>1</b> Burkholderia cepacia	6,194	<b>0.9974</b>
<b>2</b> Pseudomonas aeruginosa	> 25,000,000	<b>0.0024</b>
<b>3</b> Pseudomonas fluorescens	> 25,000,000	<b>0.0001</b>

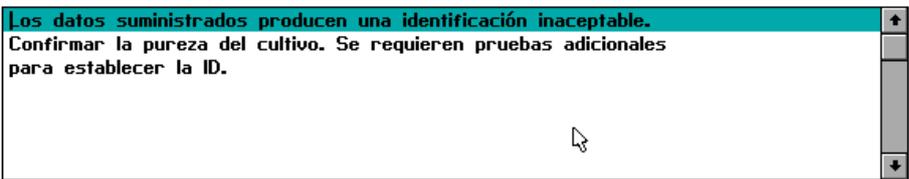
**Elaborado por:** Los autores (2019)

**Anexo 5.** Identificación bioquímica de *Escherichia coli* PG54T04, mediante el software CrystalMind

	Validez del biotipo	Confianza
<b>1</b> <i>Escherichia coli</i>	760	<b>0.9761</b>
<b>2</b> <i>Citrobacter freundii</i>	54,885	<b>0.0239</b>
<b>3</b> <i>Pantoea agglomerans</i>	103,461	< <b>0.0001</b>

**Elaborado por:** Los autores (2019)

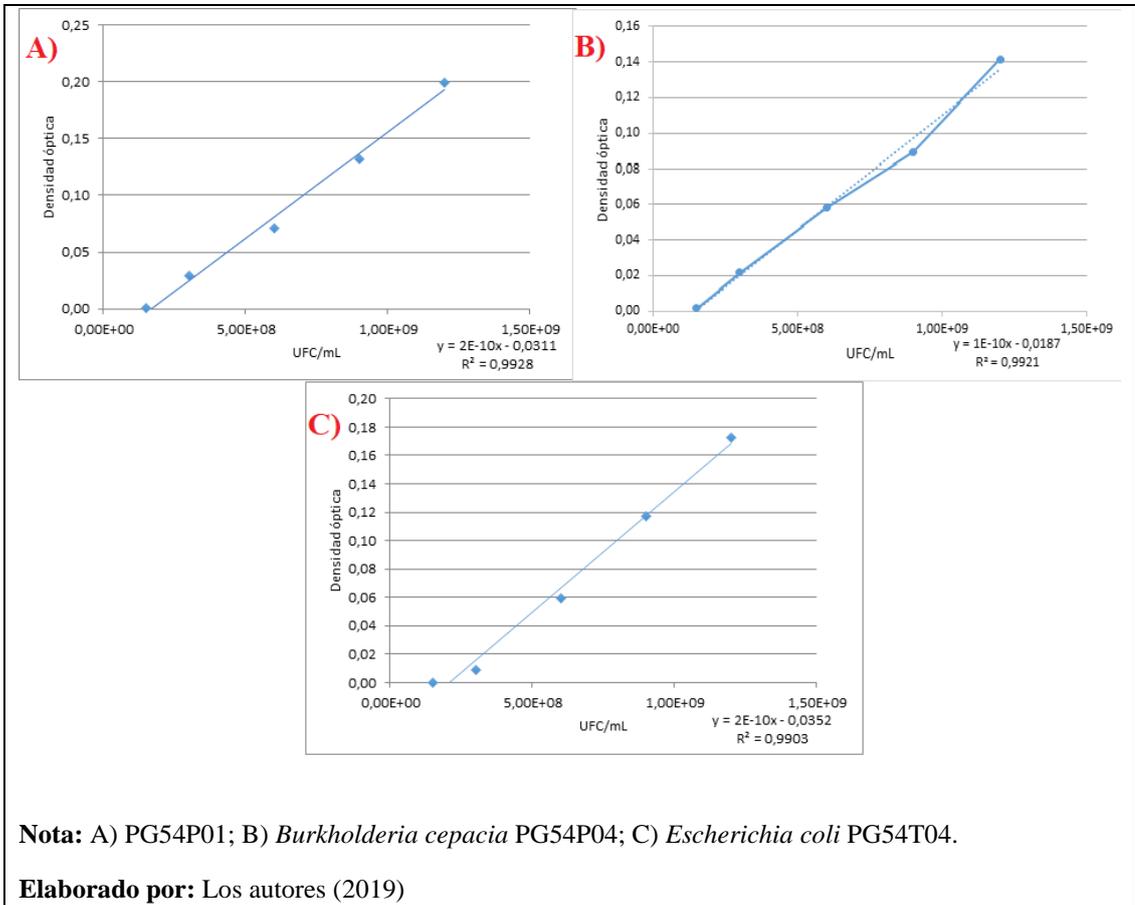
**Anexo 6.** Resultado de la identificación bioquímica de la cepa PG54P01, mediante el software CrystalMind



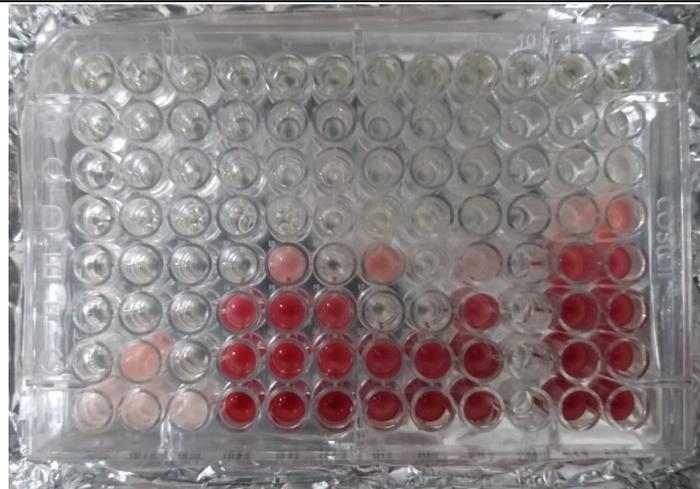
Los datos suministrados producen una identificación inaceptable.  
Confirmar la pureza del cultivo. Se requieren pruebas adicionales para establecer la ID.

Elaborado por: Los autores (2019)

**Anexo 7.** Curva de calibración de PG54P01, *Burkholderia cepacia* PG54P04 y *Escherichia coli* PG54T04

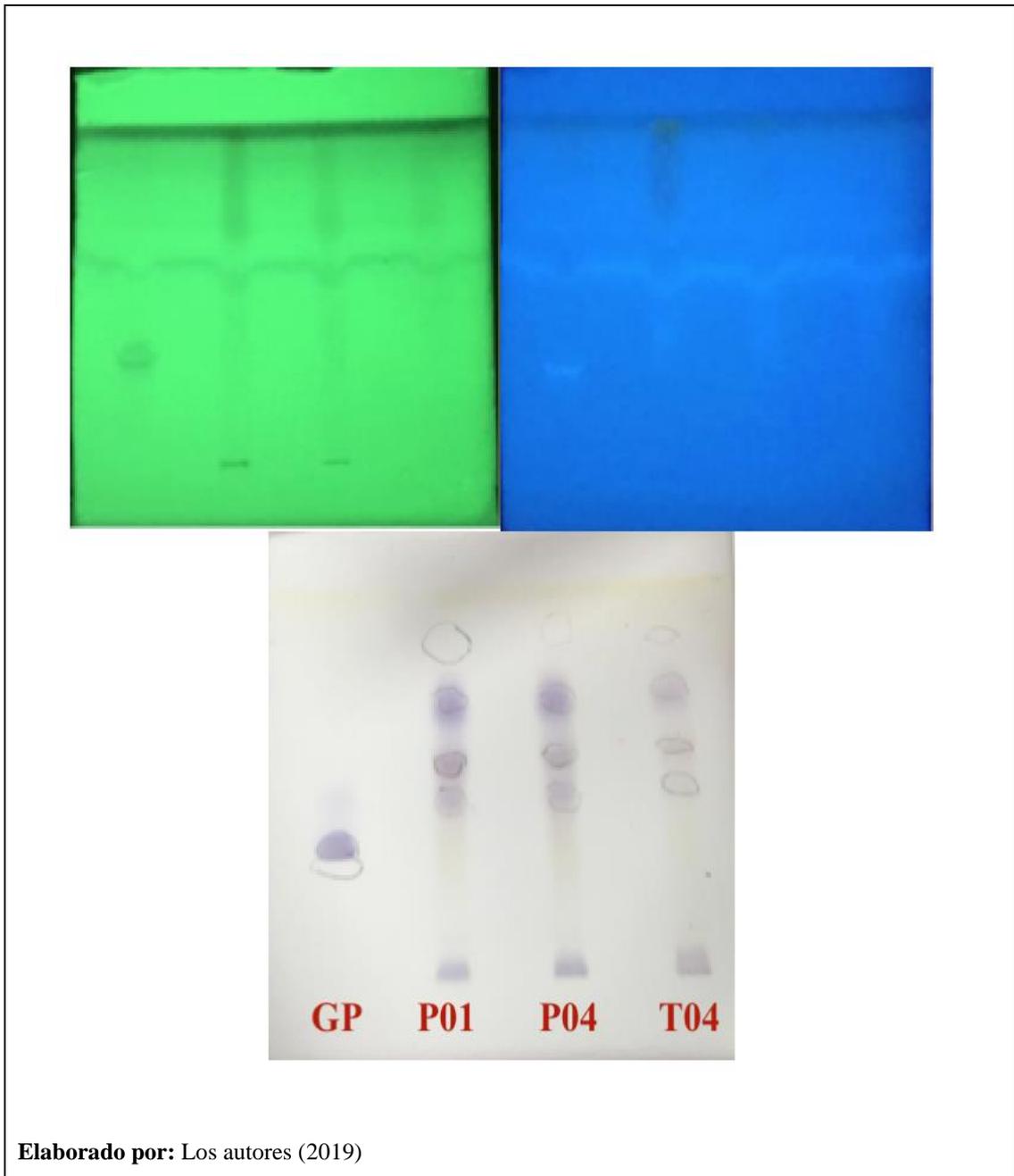


**Anexo 8.** Determinación de la tolerancia a glifosato mediante microdilución en caldo



**Elaborado por:** Los autores (2019)

**Anexo 9.** Cromatografía TLC de la biodegradación en 5 días por las cepas PG54P01, PG54P04 y PG54T04 vistas bajo luz UV a 254 nm, 356 nm y con revelador de ninhidrina



**Elaborado por:** Los autores (2019)

**Anexo 10.** Cromatografía TLC de la biodegradación a los 15 días por las cepas PG54P01, PG54P04 y PG54T04 vistas bajo luz UV a 254 nm, 365 nm y con revelador de ninhidrina

