

Degradación biológica de glifosato

Biological degradation of glyphosate

DOI: 10.53499/sfjeasv2n2-015

Received in: January 3rd, 2022

Accepted in: March 31th, 2022

María Silvina Sobrero

Magister en Ciencia y Tecnología de alimentos por la Facultad de Ingeniería Química
Universidad Nacional del Litoral

Institución: Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL, Santa Fe, Argentina

Dirección: Ciudad Universitaria. N° Km 0, 3000, RN168, Santa Fe

Correo electrónico: ssobrero@fcb.unl.edu.ar

Nilda R. Marsili

Dr. en Ciencias Biológicas por Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL, Santa Fe, Argentina

Institución: Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL, Santa Fe, Argentina

Dirección: Ciudad Universitaria. N° Km 0, 3000, RN168, Santa Fe

Correo electrónico: nmarsili@fcb.unl.edu.ar

Agustina V. Schenone

Dr. en Ciencias Biológicas por Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL, Santa Fe, Argentina

Institución: INTEC (UNL-CONICET), Santa Fe, Argentina

Dirección: Colectora RN168, Santa Fe

Correo electrónico: aschenone@fcb.unl.edu.ar

Ricardo Manzo

Dr. en Química por la Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral

Institución: INTEC (UNL-CONICET), Santa Fe, Argentina

Institución: Facultad de Ingeniería Química, Cátedra de Microbiología, UNL, Santa Fe, Argentina

Dirección: Colectora RN168, Santa Fe

Dirección: Calle Santiago del Estero 2829. Santa Fe

Correo electrónico: manzorricardo@gmail.com

Laura N. Frisón

Magister en Ciencia y Tecnología de alimentos por la Facultad de Ingeniería Química
Universidad Nacional del Litoral

Institución: Facultad de Ingeniería Química, Cátedra de Microbiología, UNL, Santa Fe, Argentina

Dirección: Calle Santiago del Estero 2829. Santa Fe

Correo electrónico: lfrisón@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

La necesidad de producir más alimentos ha llevado al aumento del uso de pesticidas, entre ellos glifosato, el cual es ampliamente empleado en la producción de soja transgénica. Esto ha implicado que crezcan los casos de intoxicaciones y contaminación de recursos naturales. Por tal motivo los entes gubernamentales han formulado instrucciones de manipulación y de descarte de los envases comerciales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de *Candida tropicalis* LMFIQ 703 para disminuir la concentración de glifosato en el tercer enjuague de bidones y así reducir el riesgo de impacto ambiental adverso que producen los residuos de pesticida en los envases vacíos almacenados por largos periodos de tiempo. Se sembraron suspensiones de levadura sin adaptación, en soluciones de Credit® Amonio (Ingrediente activo: sal amónica de la N-fosfonometil glicina) con concentración conocida (similar a la del tercer enjuague). Se incubó a 28°C durante 28 días y se realizó el recuento microbiológico de colonias de levadura cada 7 días. La determinación de la concentración de glifosato se hizo por fluorimetría con calibración multivariada y HPLC. Las levaduras se mantuvieron viables durante todo el experimento, con una disminución inicial por adaptación y una concentración final similar a la inicial. Los resultados de la cuantificación de glifosato a través de fluorescencia y calibración multivariada, aprovechando la ventaja de segundo orden del algoritmo MCR-ALS resultaron comparables con los obtenidos por el método de referencia (HPLC). Se puede concluir que la biorremediación propuesta fue eficiente ya que la concentración de glifosato disminuyó un 39%.

Palabras clave: glifosato, biorremediación, salud, medio ambiente.

ABSTRACT

The need to produce more food has led to an increased usage of pesticides. One of them is glyphosate, which is widely used in soybean production. This has implied the growing of cases of intoxication and pollution of natural resource. For this reason, government agencies have formulated instructions for handling and disposal of commercial packaging. The aim of the present work was to evaluate the ability of the yeast *Candida tropicalis* LMFIQ 703 to decrease the concentration of glyphosate present in the third rinse of the containers, so as to diminish the risk of adverse ambient impact produced by the pesticide residues in empty containers stored for long periods of time. Yeast suspensions were seeded, without adaptation, in Credit Ammonium solutions (Active ingredient: ammonium salt of N-phosphonomethyl glycine) of known concentration (similar to the obtained in the third rinse). The incubation was done at 28 °C for 28 days. Glyphosate was quantified and the number of colonies was determined at different times. The concentration of the pesticide was done by a fluorimetric method with multivariate calibration as well as by HPLC. Yeasts remained viable throughout the experiment, with an initial decrease because of adaptation and a final concentration similar to the initial. The quantification results of glyphosate by the fluorimetric technique with the aid of the second order advantage achieved by MCR-ALS were comparable with those acquired by the reference method (HPLC). It can be concluded that the proposed bioremediation is efficient since the concentration of glyphosate was decreased by 39%.

Keywords: glyphosate, bioremediation, health, environment.

1 INTRODUCCIÓN

Los problemas ambientales tienen fundamentalmente su origen e intensificación en la intervención desmedida del hombre sobre el medio que lo rodea (Blum y Eswaran, 2004; Pinzani, 2018; Solís-Castillo y col., 2018).

La biorremediación surge como una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante el uso de microorganismos para degradar los contaminantes ambientales en formas menos tóxicas. Dichos microorganismos pueden ser nativos de un área contaminada ser aislados de cualquier sitio y agregados a la zona contaminada (Alvaro y col., 2017). Esta metodología es favorable dado que resulta de bajo costo, ambientalmente amigable y con una elevada capacidad de mineralización de los compuestos recalcitrantes (Tamada y col., 2012; Contreras y Carreño, 2018).

La micorremediación emplea particularmente a los mohos para efectuar un proceso de remediación, siendo considerada como una opción prometedora en la extracción, transporte y almacenaje de compuestos tóxicos (Ayala Sánchez y col., 2015). En términos de biodiversidad, los hongos son, uno de los grupos de organismos eucariotas más abundantes de nuestro planeta (Moore y col., 2011; Goltapeh y col., 2013; Campocosio y Santiesteban, 2019). Los mismos son conocidos por su diversidad y notable capacidad para degradar materiales naturales complejos y persistentes, tales como lignina, quitina, celulosa microcristalina, entre otros. En contraste con las bacterias, los hongos son capaces de colonizar sustratos a través del crecimiento de sus hifas y consecuente incremento de la biomasa. Adicionalmente, pueden crecer bajo condiciones de stress asociado a factores ambientales, tales como la baja disponibilidad de nutrientes, actividad de agua y/o pH ácidos, donde el crecimiento bacteriano se encuentra limitado (Atagana y col., 2006).

El crecimiento demográfico ha incrementado la necesidad de producir mayor cantidad de alimentos en plazos más cortos. Esto ha llevado al aumento en el uso de herbicidas, siendo los más utilizados el glifosato, el cual es ampliamente empleado en la producción de soja, y el endosulfán, utilizado para el cultivo de trigo (Salazar López y Aldana Madrid, 2011). Es importante comprender que al aplicar cualquier plaguicida se inicia un proceso de interacción entre éste y el medio en el que está contenido hasta que finaliza su efecto y desaparece (por degradación, lixiviación o neutralización). En esta dirección, es conocido que numerosos plaguicidas son persistentes en el ambiente dado su estructura y características fisicoquímicas particulares, propiciando con ello su acumulación en agua y principalmente en suelos, pudiendo ascender por la cadena trófica y llegar a encontrarse

en concentraciones tóxicas en alimentos y/o biosistemas que consumen los seres humanos (Jaramillo y col., 2009). Con respecto a esta problemática, se han descrito numerosas publicaciones científicas donde se evidencia la incidencia y severidad de diversos tipos de cáncer, malformaciones congénitas y trastornos neurológicos producidos por diversos pesticidas (Paganelli y col., 2010).

El glifosato (N-fosfonometilglicina) es un herbicida de amplio espectro que controla malezas anuales y perennes, gramíneas y latifoliadas, siendo además selectivo para cultivos transgénicos (Mallory-Smith y Retzinger, 2003). Luego de la fumigación, hay diferentes procesos que determinan el destino final del glifosato en suelo, tales como la formación de complejos con agua e iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} , la sorción en sedimentos o partículas suspendidas en agua, el ingreso en el metabolismo de las plantas o biodegradación por microorganismos del suelo. Se ha demostrado que su degradación ocurre por procesos fotoquímicos (por efecto de la luz ultravioleta), químicos y biológicos; donde la descomposición enzimática por efecto de los microorganismos suele ser el mecanismo más efectivo, pero no el más común (Varona y col., 2009; Fan y col., 2012; Adelowo y col., 2014).

Se han descrito numerosos estudios en relación a la degradación biológica del glifosato por diferentes géneros de microorganismos, como *Achromobacter* y *Ochrobactrum* (mediante un mecanismo de degradación aeróbica), *Arthrobacter* y *Flavobacterium* (utilizándolo como única fuente de fósforo y metabolizándolo a ácido aminometilfosfónico - AMPA), *Bacillus* (utilizando dos vías enzimáticas simultáneas empleando una C-P liasa y una glifosato oxidorreductasa), *Pseudomonas* (por dos rutas distintas, la degradación a AMPA y mediante la ruptura de glifosato a glicina), *Streptomyces* sp. (degradación del glifosato de manera independiente de fosfato, a través de la escisión del enlace C-P, acompañado por la formación de sarcosina) (Haoyu Zhao, 2015).

Si bien las levaduras no han sido tan estudiadas como agentes de biotransformación, se sabe que los géneros *Debaryomyces*, *Trichosporon*, *Pichia* y *Rhodotorula*, son capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos y compuestos biarílicos (Romero y col., 2004).

El glifosato presenta una fuerte asociación a las partículas del suelo, minerales de arcillas y materia orgánica, compitiendo con el fósforo por los sitios activos. Puede alcanzar una persistencia de hasta 170 días, con una vida útil media de 45-60 días. Su baja movilidad en el suelo indica un potencial mínimo de contaminación de aguas

subterráneas. Sin embargo, puede llegar a las aguas superficiales y subterráneas tras el uso directo en las cercanías de medios acuáticos o por escorrentía o filtración tras su aplicación terrestre (Peruzzo et al., 2008). Esto ha implicado que aumenten los casos de intoxicaciones y contaminación de recursos naturales, ya que el glifosato es un herbicida no selectivo para cultivos transgénicos, muy tóxico para el ser humano, animales y vegetales no transgénicos. Por tal motivo los entes gubernamentales han formulado instrucciones de manipulación y de descarte de los envases comerciales (bidones). Con respecto a los bidones, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), recomienda antes de su almacenaje, someterlos a un triple lavado y posteriormente inutilizarlos perforando el fondo. A pesar de esta operación los bidones continúan siendo un residuo peligroso y publicó una guía de buenas prácticas llamada “el camino del plaguicida” a las etapas que atraviesa el producto desde su adquisición en el mercado hasta el almacenamiento de los envases plásticos. En la misma, analiza y recomienda los pasos a seguir en cada etapa para evitar el mal manejo y los riesgos que ello conlleva (Martens, 2012).

En la última etapa (disposición de los envases), el INTA recomienda: antes del almacenaje de los envases vacíos, los mismos deben someterse a un triple lavado y posteriormente deben ser inutilizados perforando el fondo del mismo. El acto de preparación del caldo de aspersión es el momento ideal para realizar el enjuague e inutilización de los envases, dado que entonces el agroquímico será aplicado enteramente en el lugar para el cual fue diseñado: el lote o cultivo.

El enjuague de los envases utilizados debe realizarse inmediatamente después de haberse agotado su contenido, evitando que el residuo se seque en su interior. Si no se opera de esta forma, el lavado no cumple con los resultados esperados. Cualquier enjuague hecho con posterioridad a este momento invalida su valor como mitigador del riesgo. Los envases así tratados constituyen un residuo especial y mientras permanezcan en el campo, deberán estar con tapa y etiqueta. Aun así, los envases tratados con las indicaciones y sugerencias anteriores continúan siendo residuos especiales.

OBJETIVO: En este trabajo se propuso completar la última etapa del camino del pesticida agregando un cultivo de *Candida tropicalis* LMFIQ 703 al agua del tercer enjuague con el propósito de disminuir el impacto ambiental que produce el residuo de pesticida dentro de los bidones vacíos para descarte a través de su biodegradación efectiva.

2 METODOLOGÍA

Materiales:

La solución patrón de glifosato [N-(fosfonometil) glicina] de 50 mg L^{-1} en agua desionizada y la solución derivatizante NBD-Cl (4-Cloro-7-nitrobenzofurazan) de 1 g L^{-1} en metanol, se prepararon a partir de las drogas sólidas correspondientes (Sigma-Aldrich, EEUU). La solución reguladora fosfato-borato (concentración final: $\text{H}_2\text{PO}_4\text{Na} = 0,001 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{HPO}_4\text{Na}_2 = 0,049 \text{ mol L}^{-1}$ y $\text{H}_3\text{BO}_3 = 0,050 \text{ mol L}^{-1}$) de pH 9 se preparó a partir de fosfato dibásico de sodio anhidro, fosfato monobásico de sodio anhidro y ácido bórico (Cicarelli, Argentina), en agua destilada. Se empleó el solvente alcohol metílico calidad HPLC (Biopack, Argentina), y ácido clorhídrico (Cicarelli, Argentina), calidad pro-análisis.

Para la preparación de las muestras de trabajo reales, se utilizaron envases que contenían una formulación comercial de glifosato denominada Credit® Amonio (presentación en bidones de 20 L) y provista por la empresa Nufarm (Australia). El ingrediente activo de la misma es glifosato (Sal amónica del N-fosfonometil glicina) a una concentración de 40,5% ($\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$) y en equivalente ácido de 36,8% ($\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$).

Preparación de la solución de trabajo:

Para la preparación de la solución de trabajo, se vació el remanente de la solución comercial del envase y se mantuvo 30 segundos más en posición de descarga. Se volvió el envase a la posición normal y se agregó agua desionizada hasta un cuarto de su contenido (5 L). Se tapó y agitó vigorosamente en dirección horizontal y vertical durante 30 segundos, se descartó el agua del 1° enjuague y se repitió la misma operación dos veces más. El agua del tercer enjuague fue la que se utilizó como muestra de partida para realizar los cultivos de la levadura y se la denominó M_0 .

Microorganismo:

La cepa de levadura *Candida tropicalis* LMFIQ 703 utilizada en los ensayos realizados en este trabajo fue aislada con anterioridad de efluentes de la industria agrícola e indexada al cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Reactivación:

A partir de la cepa conservada en estrías de Agar Extracto de Malta (MEA), se realizaron resiembras en tubos de 5 mL conteniendo caldo Extracto de Malta y se incubaron por 7 días a 28°C para obtener cultivos en fase exponencial de crecimiento.

Recuento de levaduras:

Un volumen de 1 mL de la suspensión reactivada se diluyó de forma seriada hasta una dilución de 10^{-7} con agua de peptona al 0,1% (m/v). Seguidamente, 1 mL de cada dilución se sembró en placas conteniendo 15 mL de medio MEA y se incubaron en estufa por 5 a 7 días a 28°C. Se realizó el recuento contando las placas que tuvieron entre 30 y 300 colonias y afectando el resultado por el factor de dilución. Los resultados se expresaron como UFC/mL (Bills y col., 2004; Beuchat y Cousin, 2002).

Ensayo de bioremediación:

A un volumen de 100 mL del agua del tercer enjuague de los bidones (M_0) se le adicionó la suspensión de levadura de forma tal de alcanzar una concentración inicial de microorganismo de $3,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Se incubó 28 días a 28°C sin agitación. Se tomaron muestras de 2 mL a los 7, 14, 21 y 28 días para la realización del recuento microbiológico de levaduras (Bills y col., 2004; Beuchat y Cousin, 2002) y la determinación de la concentración de glifosato. Estas muestras fueron denominadas M_7 , M_{14} , M_{21} y M_{28} .

Cuantificación de glifosato:

Método fluorimétrico:

Con la solución patrón de glifosato se determinó la concentración real del producto comercial CREDIT®. Para ello, se preparó un juego de calibración de seis soluciones a partir de la solución de CREDIT® 36 mg L⁻¹, por duplicado, en un rango de concentraciones de 100 a 600 µg L⁻¹. Además, se realizaron los blancos de reactivos y de muestra, también por duplicado. Todas las soluciones fueron derivatizadas con 200 µL de NBD-Cl (0,2 mmol L⁻¹), en medio alcalino, mediante el agregado de 2 mL de solución reguladora fosfato-borato (pH=9), 2 mL de metanol e incubación a 90°C durante 15 minutos. Luego, las soluciones se enfriaron en baño de hielo (4°C), se acidificó el medio con 300 µL de HCL 6,0 mol L⁻¹ (pH=1) y se llevó a un volumen final de 5 mL con metanol. Antes de registrar la fluorescencia se lleva la solución a pH=1 mediante el

agregado de ácido clorhídrico. Posteriormente, las matrices de excitación-emisión de fluorescencia se midieron en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-55 (Waltham, EEUU) variando las longitudes de onda de excitación entre 400 y 500 nm cada 0,5 nm, registrando los espectros de emisión entre 430 y 500 nm cada 5 nm. La velocidad de barrido fue de 600 nm min⁻¹, las aberturas de ambos monocromadores se fijaron en 15 nm y el voltaje del detector en 700 V. Para el cálculo de las concentraciones se utilizó el algoritmo quimiométrico MCR-ALS (España), que se implementó a través de la interfaz gráfica provista por R. Tauler en su página <http://www.mcrals.info> y se ejecutó utilizando MATLAB 7.1

Método HPLC:

El glifosato se derivatizó con cloruro de p-toluenosulfonilo (TsCl) previo a la corrida cromatográfica. Seguidamente, se procedió a su determinación siguiendo el protocolo de referencia propuesto por Kawai y col. (1991) utilizando un HPLC marca Shimadzu (modelo 5A, Japón) y equipado con detector UV-VIS y jeringa de inyección modelo 7125 (Rheodyne, EEUU)

Análisis estadísticos:

Los datos fueron analizados usando análisis de la varianza (ANOVA). Cuando se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$), se observó una prueba de comparación múltiple de medias usando la prueba de diferencias significativas mínimas (LSD). Para el análisis estadístico se utilizó Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.11 (StatPoint Technologies Inc., EEUU). Además, se emplearon el software OriginPro 9 (Origin lab Corporation, EEUU) y Sigma Plot 10.0 (Systat Software Inc., EEUU).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los recuentos de *Candida tropicalis* LMFIQ 703 de las muestras: M₀, M₇, M₁₄, M₂₁ y M₂₈ y la cuantificación de glifosato por el método fluorimétrico y por HPLC se muestran en **Tabla 1**.

Tabla 1: Recuento microbiológico de *Candida tropicalis* LMFIQ 703 y cuantificación de glifosato por el método fluorimétrico y por HPLC para las muestras M₀, M₇, M₁₄, M₂₁ y M₂₈.

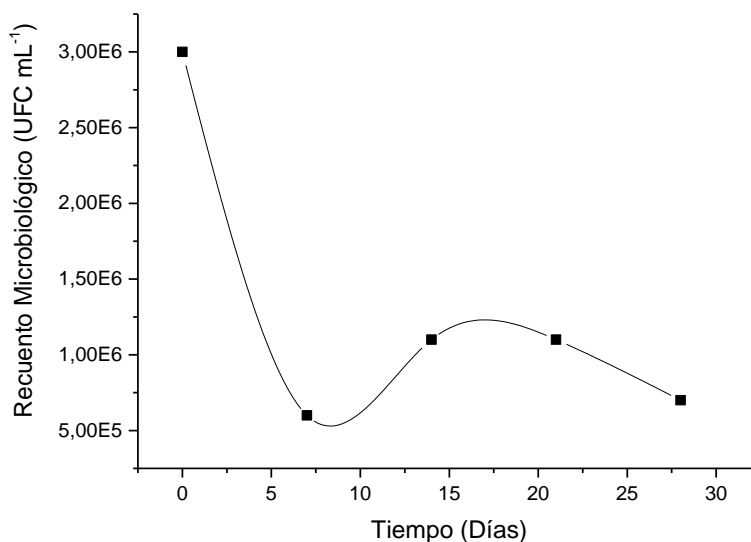
Muestras	M ₀	M ₇	M ₁₄	M ₂₁	M ₂₈
Ufc mL ⁻¹	3,0 10 ⁶	6,0 10 ⁵	1,1 10 ⁶	1,1 10 ⁶	7,0 10 ⁵
Fluorimetría glifosato (mgL ⁻¹)*	360 ± 2,3	308 ± 2,2	304 ± 1,8	305 ± 1,2	219 ± 1,1
HPLC glifosato (mgL ⁻¹)*	351 ± 2,3	278 ± 2,3	276 ± 2,3	261 ± 2,3	226 ± 2,3

* Concentración de glifosato con su correspondiente desviación estándar

Evolución del recuento de *Candida tropicalis* LMFIQ 703 tras 28 días de ensayo:

Con respecto al desarrollo microbiológico, puede observarse un leve descenso inicial de la cantidad de UFC mL⁻¹, el cual podría deberse tanto a la no utilización de cepas acondicionadas al glifosato como la muerte de parte de la población microbiana sensible al herbicida (aunque se trata de una cepa taxonómicamente bien definida y homogénea en cuanto a las pruebas bioquímicas realizadas, es heterogénea poblacionalmente en cuanto a su resistencia al pesticida). Inocular cepas pre-acondicionadas con glifosato hubiese evitado la aparición de esta fase lag no deseada e incrementado potencialmente el porcentaje de degradación del herbicida por parte de la levadura. Finalmente al día 28, *Candida tropicalis* LMFIQ 703 permaneció viable y en una concentración cercana similar al día 5 (ver **Figura 1**).

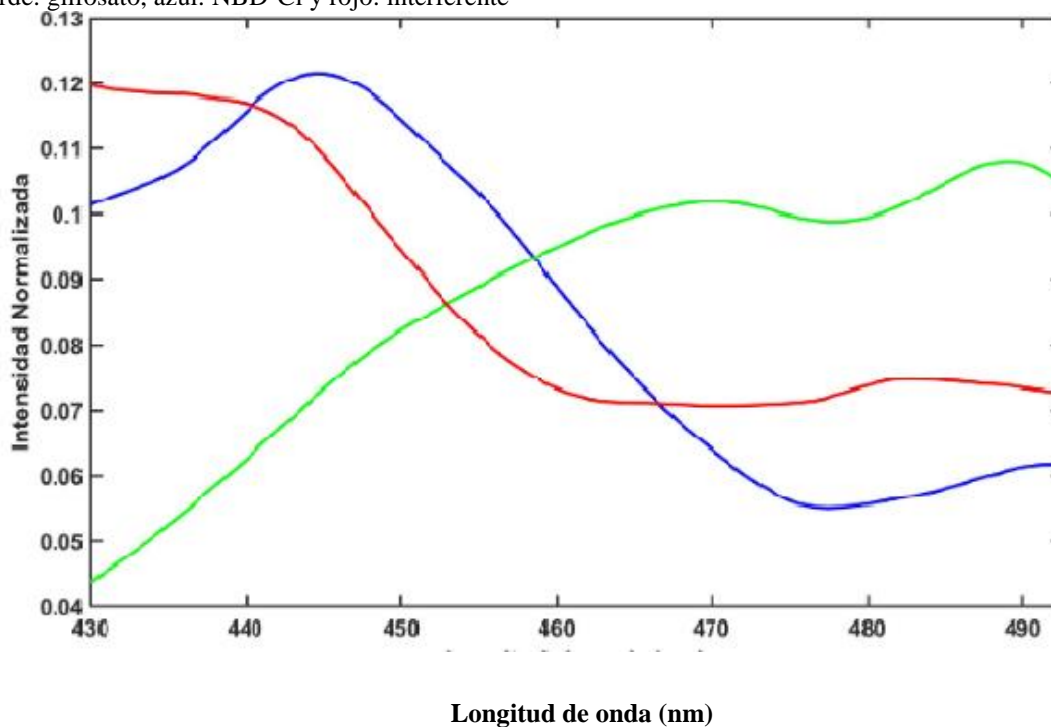
Figura 1. Evolución de *Candida tropicalis* LMFIQ 703 a lo largo de 28 días de ensayo (UFC mL⁻¹)



Cuantificación del glifosato

Para la cuantificación del glifosato en las muestras, se preparó la curva de calibrado según previamente descrito. Una vez obtenidas las matrices de excitación-emisión de cada solución, se apilaron en columnas, formando la matriz aumentada. El número de componentes obtenidos por descomposición de valores singulares (SVD) fue de 3, debido a la presencia de NBD-Cl, glifosato, y una interferencia desconocida. Se obtuvieron las estimaciones iniciales a través de SIMPLISMA (SIMPLe-to-use Interactive Self-modeling Mixture Analysis) (**Figura 2**). Además, se aplicaron las restricciones de no negatividad en los perfiles espectrales (**S**) y de concentración (**C**), y la restricción trilinealidad durante las iteraciones de MCR-ALS.

Figura 2: Cálculo de las estimaciones iniciales con SIMPLISMA (espectros de excitación). Verde: glifosato, azul: NBD-Cl y rojo: interferente

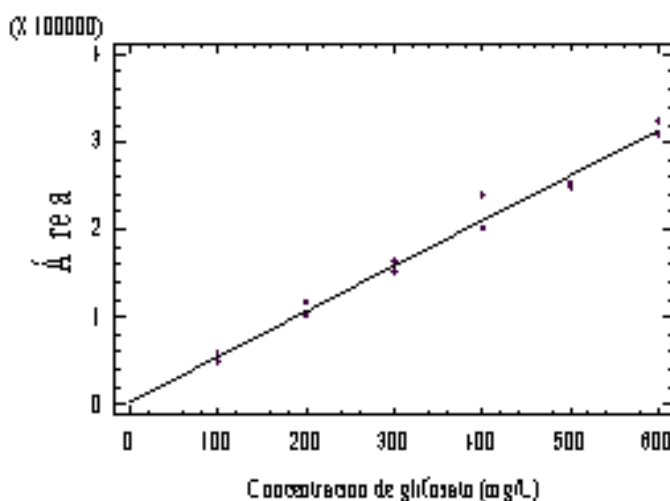


Una vez alcanzada la convergencia, se utilizaron las áreas bajo los perfiles obtenidos en **C** para construir la curva de calibrado. En la **Figura 3** se puede observar la curva de calibrado para el CREDIT®, donde se graficaron las áreas antes mencionadas en función de las concentraciones correspondientes.

Para obtener la ecuación de la recta, se aplicó una regresión lineal simple. Como resultado se obtuvo la ecuación $y = 2633,9 + 518,55 x$ y un valor de $R^2 = 98,42 \%$

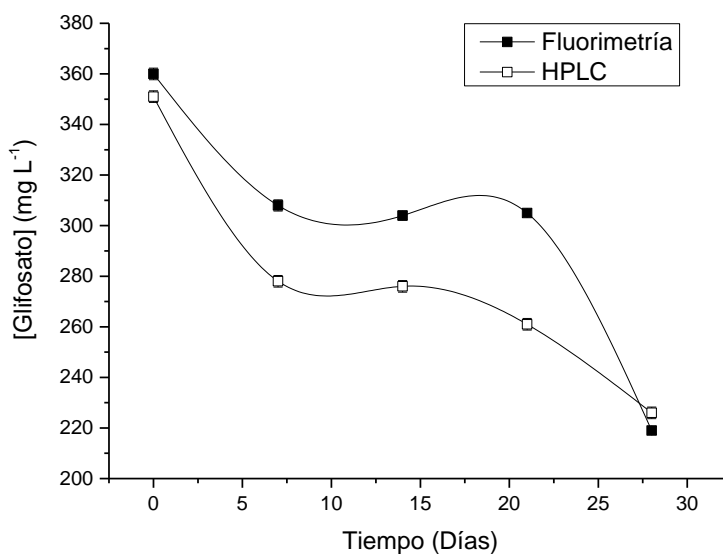
La cuantificación se llevó a cabo a través de la regresión lineal de las áreas bajo los perfiles obtenidos en la matriz **C**, para cada muestra de calibración, en función de los valores de concentración nominales. Los valores de las predicciones figuran en la **Tabla 1**.

Figura 3: Curva de calibrado: concentración de glifosato vs área bajo los perfiles obtenidos en la matriz C



Se graficaron los resultados de las predicciones de glifosato obtenidos por ambos métodos a lo largo de 28 días de ensayo (**Figura 4**).

Figura 4: Variación de la concentración de glifosato por el método fluorimétrico (línea llena) y aplicando HPLC (línea cortada)

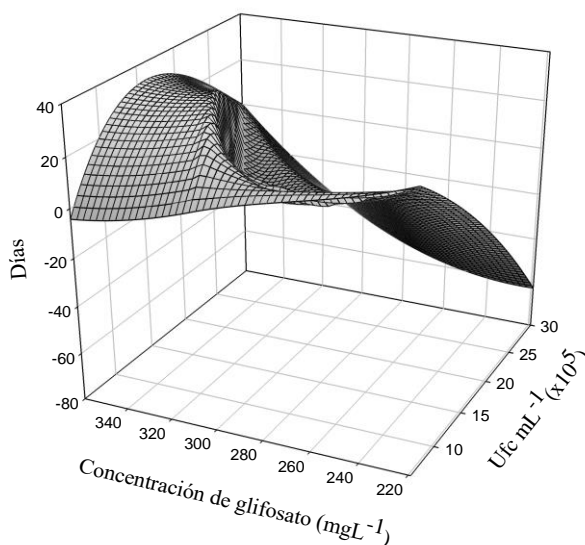


Se evaluó primeramente los coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados, en ambos casos los valores obtenidos se encuentran dentro del rango esperado para los datos de una distribución normal (-2 a +2). Posteriormente se aplicó un test estadístico de comparación de muestras pareadas donde se planteó una hipótesis nula (H_0) donde la diferencia entre el Método F y el Método HPLC es igual a 0,0 y una hipótesis alternativa (H_1) donde la diferencia entre ambos métodos es diferente de 0,0.

Dado que el valor p para este test resultó tener un valor de 0,32 y es mayor a 0,05, no se rechazó la hipótesis nula para un nivel de confianza del 95,0%. Así, podemos concluir que los valores en las estimaciones de las concentraciones de glifosato son comparables estadísticamente, apreciación observada también de forma gráfica.

En la **Figura 5** puede observarse la disminución de la concentración de glifosato en función del tiempo de cultivo y del número de microorganismos (UFC mL^{-1}).

Figura 5: Disminución de la concentración de glifosato en función del tiempo de cultivo y del número de microorganismos (UFC mL^{-1})



Los resultados de la degradación del glifosato contenido en el agua del tercer enjuague de los bidones realizada *Candida tropicalis* LMFIQ 703 se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Porcentajes de degradación microbiana del glifosato en el medio de fermentación.

Método empleado para cuantificar el herbicida	Concentración inicial* (M ₀) (mgL ⁻¹)	Concentración final* (M ₂₈) (mg L ⁻¹)	% de degradación
Fluorimetría	360,0 ± 2,3	219, 5 ± 1,1	39,03 ± 0,17
HPLC	351,6 ± 2,3	226,6 ± 2,3	35,55 ± 0,46

La degradación del herbicida podría haber ocurrido por dos vías: produciendo intermediarios como glicina o como ácido aminometilfosfónico (AMPA) (Martínez Nieto y col., 2012). El AMPA es el principal producto de la degradación del glifosato y presenta una toxicidad comparable. La ruta de descomposición del AMPA continúa hacia el ácido fosfórico y dióxido de carbono, siendo estos compuestos compatibles con la composición del suelo y de baja toxicidad. Sin embargo, diversos estudios demuestran que el AMPA tiene mayor persistencia que el glifosato, es decir que logra un fuerte enlace con las partículas del suelo, disminuyendo su velocidad de degradación y aumentando su concentración debido a la bioacumulación del mismo (Bozzo de Brum, 2010).

Diversos autores mostraron en estudios previos que, aunque el glifosato es resistente a la degradación, determinadas bacterias resultaron ser biodegradadoras efectivas (Albrechtsen y col., 2001; Busse y col., 2001). Por otro lado, entre los hongos sólo algunas especies de podredumbre blanca y filamentosas demostraron utilizarlo y subsecuentemente degradarlo (Gesell et al., 2001; Omar, 1998; Klimek et al., 2001).

Las levaduras han sido las menos explotadas como biodegradadores, a pesar de producir potentes agentes emulsionantes y enzimas que han conseguido la biotransformación de contaminantes de diversos contaminantes (Hammer y col., 1998; Kurtzman y Fell, 1998). Por ejemplo, levaduras del género *Debaryomyces* spp. (Lange et al., 1998), *Trichosporun* spp (Sietmann y col., 2002), *Pichia* spp, *Rhodotorula* spp y *Candida* spp. (Romero y col., 2000; Romero y col., 2002) han sido estudiadas como especies degradadoras de contaminantes recalcitrantes, tales como hidrocarburos policíclicos aromáticos.

También ha sido reportado que *Candida krusei* aislada de suelos contaminados con glifosato y cultivada en medio con glifosato y AMPA, ha sido capaz de reducir en un 66% la concentración de dicho contaminante en 20 días de ensayo (Romero y col., 2004).

No existen reportes que indiquen que las levaduras son capaces de metabolizar organofosfonatos, aunque estos microorganismos fueron los dominantes en los

aislamientos realizados en ambientes contaminados con glifosato y estudiados oportunamente por Romero y col. (2001).

4 CONCLUSIONES

Se logró la cuantificación de glifosato a través de fluorescencia y calibración multivariada, aprovechando la ventaja que provee el algoritmo de segundo orden MCR-ALS. Los resultados de las concentraciones de glifosato obtenidas con el método fluorimétrico y el método de referencia (HPLC) son comparables, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos. El espectro observado del interferente no identificado podría tratarse de un metabolito del glifosato, como por ejemplo, AMPA. La levadura *Candida tropicalis* LMFIQ 703 se mantuvo viable a lo largo del estudio (28 días) y logró reducir la concentración inicial del pesticida en un 39%, por lo cual dicha estrategia de degradación biológica podría utilizarse para el tratamiento de los envases en una mayor escala.

REFERENCIAS

- Adelowo F.E., Olu-Arotiowa O.A., Amuda O.S. (2014). Biodegradation of Glyphosate by Fungi Species. *Advances in Bioscience and Bioengineering* ISSN 2201-8336 Volume 2, Number 1, 2014, 104-118.
- Albrechtsen H.J., Mills M.S., Aamand J., Bjerg P.L. (2001). Degradation of herbicides in shallow danish aquifers: an integrated laboratory and field study. *Pesticidal Management Science*, 57,341-350.
- Alvaro C. E. S., Arocena L. A., Martínez M. A., Nudelman N. E. S. (2017). Biodegradación aerobia de fracciones de hidrocarburos provenientes de la actividad petrolera en un suelo de la región Patagonia norte, Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(2), 247-257.
- Atagana H., Haynes R., Wallis F. (2006). Fungal bioremediation of creosote-contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. *Water, Air and Soil pollution*,172 (1), 201 - 219.
- Ayala Sánchez N., Soria Mercado I., Bautista Romero L., Esparza Ibarra E. L., Guerra Rivas G. (2015). *Los hongos en la biorremediación*. Editorial Universidad Autónoma de Guerrero. ISBN 978-607-7760-78-8.
- Beuchat L., Cousin M. (2002). Yeast and molds. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Editores Downes, F.; Keith, I. 4th Edition. American Public Health Association. 209 – 215.
- Bills G.F., Christensen, M., Powell M., Thorn, G. (2004). Saprobic soil fungi. In: *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Mueller GM, Bills GF, Foster MS (eds) 1stedition. Elsevier Academic Press, Oxford, pp 271–302.
- Blum W. E. H., Eswaran H. (2004). Soils and sediments in the Anthropocene. *Journal of Soils and Sediments*, 4(2), 71.
- Bozzo de Brum M. (2010). *Persistencia del glifosato y efecto de sucesivas aplicaciones en el cultivo de soja en agricultura continua en siembra directa sobre parámetros biológicos del suelo*. [Tesis de Magister en Ciencias Ambientales. Universidad de la República]. Montevideo, Uruguay.
- Busse M.D., Ratcliff A.W., Shestak C.J., Powers, R.F. (2001). Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1777-1789.
- Campocosio A., Santiesteban H. (2019). *Fungal Bioremediation*. Boca Raton: CRC Press, 394.
- Contreras, H., Carreño, C. (2018). Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 1(1), 27-33.
- Fan J. Y., Yang G. X., Zhao H. Y., Shi G. Y., Geng Y. C. (2012). Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 58, 263–271.

- Gesell M., Hammer E., Specht M., Francke W., Schauer F. (2001). Biotransformation of biphenyl by *Paecilomyces lilacinus* and characterization of ring cleavage products. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1551-1557.
- Goltapeh E. M., Danesh Y. R., Varma A. (2013). *Fungi as bioremediators*. Springer Science & Business Media, (32), 489.
- Hammer E., Krowas D., Schäfer A., Specht M., Francke W., Schauer F. (1998). Isolation and characterization of a dibenzofuran-degrading yeast: identification of oxidation and ring cleavage products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 2215-2219.
- Haoyu Zhao K. T., Jianyi Z., Shengnan L., Han G., Xiaogang Z. (2015). Bioremediation potential of glyphosate-degrading *Pseudomonas* spp. Strains isolated from contaminated soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 61, 165–170.
- Jaramillo F., Meléndrez M.E., Aldana M.L. (2009). Toxicología de los Plaguicidas. En *Toxicología Ambiental*. Jaramillo, F., Rincón, A.R. y Rico, R.M. (ed.), pp. 270. Textos Universitarios. Universidad Autónoma de Aguascalientes - Universidad de Guadalajara. México.
- Kawai S., Uno B., Tomita M. (1991). Determination of glyphosate and its major metabolite aminomethylphosphonic acid by high-performance liquid chromatography after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride. *Journal of Chromatography A*, 540, 411-415.
- Klimek M., Lejczak B., Kafarski P., Forlani G. (2001). Metabolism of the phosphonate herbicide glyphosate by a non-nitrate-utilizing strain of *Penicillium chrysogenum*. *Pesticidal Management Science* 57: 815-821.
- Kurtzman C.P., Fell J.W. (1998). *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier Science, 4th. ed. The Netherlands, pp. 1- 1934.
- Lange J., Hammer E., Specht M., Francke M. W., Schauer F. (1998). Biodegradation of biphenyl by the ascomycetous yeast *Debaryomyces vanriijiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50: 364-368.
- Mallory-Smith C. A., Retzinger E. J. Jr. (2003). Revised Classification of Herbicides by Site of Action for Weed Resistance Management Strategies. *Weed Technology*. 17, 3: 605-619.
- Martens F. (2012). *Guía para el uso adecuado de plaguicidas y la correcta disposición de sus envases*. Boletín de Divulgación N°41, ISSN 0328-3380, INTA, Ministerio de agricultura, ganadería y pesca de la República Argentina.
- Martínez Nieto P., Bernal Castillo J., Agudelo Fonseca E., Bernier López S. (2012). Tolerancia y degradación del glifosato por bacterias aisladas de suelos con aplicaciones frecuentes de Roundup. *Revista Pilquen, Sección Agronomía*. Año XIV. N° 12. 1-12. Colombia. 2012.
- Moore D., Robson G. D., Trinci A. P. J. (2011). *21st century guidebook to fungi*, Cambridge University Press. New York, NY, 640.
- Omar S.A. (1998). Availability of phosphorus and sulfur of insecticide origin by fungi. *Biodegradation* 9: 327-336.

- Paganelli A., Gnazzo V., Acosta H., López S.L., Carrasco A.E. (2010). Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 10: 1586–1595.
- Peruzzo P., Porta A., Ronco A. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* V.156. 61 – 66. La Plata, Argentina. 2007.
- Pinzani A. (2018). The new millenarianism: On the end of the world and of capitalism as we know them. *Civitas - Revista de Ciências Sociais*, 18(3), 539-562.
- Romero M.C., Reinoso E., Moreno Kiernan A., Córdoba S. (2004). Biodegradation of glyphosate by wild yeast. *Revista mexicana de micología*. 19: 45-50, 2004
- Romero M. C., Hammer E., Cazau M.C., Arambarri A.M. (2001). Selection of autochthonous yeast strains able to degrade biphenyl. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17: 591-594.
- Romero M., C., Gatti M.E., Cordoba S., Cazau M.C., Arambarri A.M. (2000). Physiological and morphological characteristics of yeasts isolated from waste oil effluents. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 683-686.
- Romero M.C., Salvioli M.L., Cazau M.C., Arambarri A.M. (2002). Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi. *Environmental Pollution* 117: 159-163.
- Salazar López N. J. Aldana Madrid M.L. (2011). Herbicida Glifosato: Usos, toxicidad y regulación. *Revista de ciencias biológicas y de la salud de la universidad de Sonora*. México. Vol. XIII, N°2: 23-28.
- Sietmann R., Hammer E., Schauer F. (2002). Biotransformation of biaryllic compounds by yeasts of the genus *Trichosporon*. *Systematic and Applied Microbiology* 25: 332-339.
- Solís-Castillo B., Fernández G., Vázquez-Castro G., García-Ayala G., Bocco G., Ortíz M. A. (2018). Paisaje cultural y evidencias estratigráficas del antropoceno en la Mixteca alta, Oaxaca. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 70 (1), 147-171.
- Tamada I. S., Montagnolli R. N., Lopes P. R. M., Bidoia E. D. (2012). Toxicological evaluation of vegetable oils and biodiesel in soil during the biodegradation process. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1576-1581.
- Varona M., Henao G., Días S., Lancheros A., Murcia A., Rodríguez N., Alvarez V. (2009). Evaluación de los efectos del glifosato y otros plaguicidas en la salud humana en zonas objeto del programa de erradicación de cultivos ilícitos. *Biomédica*. V.29 (3). 456 – 475. Bogotá.