

**IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE BACTERIAS CAPACES
DEDEGRADAR GLIFOSATO**

STEPHANÍA ÁNGEL MUÑOZ

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
CALI
2014**

**IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE BACTERIAS CAPACES
DEDEGRADAR GLIFOSATO.**

STEPHANIA ANGEL MUÑOZ

Proyecto de Grado II

Director:

Aram Joel Panay Ph.D

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
CALI
2014**



APROBADO POR:

Andrés Castillo

(Andrés Castillo)
Evaluador.

Andrés Felipe Dávalos

(Andrés Felipe Dávalos)
Evaluador Externo.

Aram Joel Panay

(Aram Joel Panay)
Director del Proyecto.

CONTENIDO

CONTENIDO DE ILUSTRACIONES	4
CONTENIDO DE TABLAS.....	5
CONTENIDO DE GRÁFICAS.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Planteamiento del problema	11
1.2 Marco teórico y estado del arte.....	12
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo general.....	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. METODOLOGÍA	24
3.1 Obtención de las muestras	24
3.2 Aislamiento mediante el uso de medios de cultivo enriquecidos.	24
3.2.1 Técnica de siembra por dilución en serie	26
3.3 Preservación de las bacterias.....	26
3.4 Cuantificación del Glifosato degradado	26
3.4.1 Limpieza del electrodo	27
3.4.2 Curva de calibración.....	27
3.4.3 Tratamiento de las muestras	27
3.4.4 Determinación del porcentaje de degradación	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1 Aislamiento mediante el uso de medios de cultivo enriquecidos	29
4.2 Cuantificación del Glifosato degradado	31
4.3 Determinación del porcentaje de degradación.....	34
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	36
6. CONCLUSIONES	43
7. RECOMENDACIONES.....	44
8. BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXOS.....	49

CONTENIDO DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Estructura Química del Glifosato.	12
Ilustración 2 Ruta metabólica donde actúa el Glifosato.	13
Ilustración 3 Rutas de degradación del GYP en suelos.	14
Ilustración 4 Excitación y respuesta de la Voltametría Cíclica.....	19
Ilustración 5 Esquema de la Incubación No.1 con Concentración final de 0.5g/L de Glifosato.	25
Ilustración 6 Incubación de la muestra.....	26
Ilustración 7 Celda Electroquímica para Identificación y cuantificación del Glifosato degradado.....	27
Ilustración 8 Formación del complejo Pt-Glifosato.	40
Ilustración 9 Reacción redox del complejo Pt-GYP.	40
Ilustración 10 Valores del pka del GYP.....	41
Ilustración 11 Esquema del procedimiento de diluciones en serie para las muestras microbiológicas líquidas y sólidas.	49
Ilustración 12 Muestra de un suelo 1	49
Ilustración 13 Muestra de un suelo 2	49
Ilustración 14 Muestra de un suelo 3	50
Ilustración 15 Muestras de los tres suelos	50
Ilustración 16 Secado de la muestra de suelo	50

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1 Información del Glifosato. Comparación entre Monsanto e investigaciones independientes.	15
Tabla 2 Tabla de resultados de concentración final y degradación de Glifosato.	35
Tabla 3 Propiedades Fisicoquímicas del Glifosato.	51
Tabla 4 Composición del medio de cultivo selectivoMSM ₁	51
Tabla 5 Composición del medio de cultivo selectivoMSM ₂	51
Tabla 6 Composición del medio de cultivo enriquecido.	51

CONTENIDO DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Crecimiento de las bacterias en el medio MSM ₁	30
Gráfica 2 Crecimiento de las bacterias en el medio MSM ₂	30
Gráfica 3 Voltamograma cíclico del Glifosato comercial.	31
Gráfica 4 Voltamograma cíclico del medio MSM ₁ con y sin Glifosato comercial.	32
Gráfica 5 Voltamograma cíclico del medio MSM ₂ con y sin Glifosato comercial.	32
Gráfica 6 Voltamograma cíclico de la comparación de los medios MSM ₁ y MSM ₂ con el Glifosato comercial.	33
Gráfica 7 Voltamograma cíclico de la comparación del medio MSM ₁ con una concentración inicial de Glifosato, con las muestras M2 y M3 incubadas con este medio durante 6 días.	33
Gráfica 8 Voltamograma cíclico de la comparación del medio MSM ₂ con una concentración inicial de Glifosato, con las muestras M2 y M3 incubadas con este medio durante 6 días.	34
Gráfica 9 Voltamograma cíclico de glifosato en un electrodo de Pt (Balanta & Quiñonez, 2014)	39
Gráfica 10 Curva de Calibración para la cuantificación del Glifosato	52
Gráfica 11 Voltamperograma cíclico de la comparación del porcentaje de degradación de Glifosato en la muestra M2 durante 6 días en los dos tipos de medios (MSM ₁ y MSM ₂).	53
Gráfica 12 Voltamperograma cíclico de la comparación del porcentaje de degradación de Glifosato en la muestra M3 durante 6 días en los dos tipos de medios (MSM ₁ y MSM ₂).	53

LISTA DE ABREVIATURAS

GLY	Glifosato
ICA	Instituto Agropecuario
EPA	Agencia de Protección del Medio Ambiente
AMPA	Ácido Aminometilfofónico
EPSP	5-enolpiruvil shikimato-3-p-sintetasa
DPV	Voltimetría de Pulso Diferencial
SWV	Voltimetría de onda Cuadrada
OMS	Organización Mundial de la Salud
MSM ₁	Medio de Cultivo como Única Fuente de Carbono
MSM ₂	Medio de Cultivo como Única Fuente de Fósforo

RESUMEN

En la actualidad existen gran variedad de herbicidas, dentro de ellos el más utilizado es el Glifosato, cuya acción se caracteriza por ser de amplio espectro y no selectivo para el control post-emergente de una amplia gama de malezas. Este Compuesto actúa a nivel sistémico y no es metabolizado por las plantas, es translocado generando reservorios en las regiones meristemáticas incluidas las raíces y nódulos.

Actualmente, con la implementación de los cultivos transgénicos el uso de herbicidas a base de Glifosato conocido generalmente como Roundup, ha generado un aumento en su consumo, debido a la resistencia que tienen este tipo de cultivos hacia este compuesto, lo que podría ocasionar posibles problemas en la biótica encontrada en los suelos de estas plantaciones. Ya que el herbicida, puede filtrarse a través de las diferentes capas de la tierra eliminando consigo los microorganismos beneficiosos del suelo, incluyendo los que actúan como control biológico de patógenos, con su movimiento puede llegar hasta pozos de aguas subterráneas o desembocar en ríos cercanos del cultivo.

Con la premisa de que para la degradación de este organofosforado utilizar el metabolismo microbiano se considera como una de las principales vías, el objetivo de este trabajo consistió en aislar bacterias capaces de degradar Glifosato. Para ello, se tomaron tres muestras de suelo del parqueadero de la Universidad Icesi donde se había aplicado este compuesto. Las bacterias se aislaron a partir de dos medios de cultivos selectivos, donde el primero MSM₁ las bacterias utilizaron el Glifosato como única fuente de carbono y el segundo MSM₂ como única fuente de fósforo. Encontrándose que las bacterias crecían en un 62% más en el cultivo MSM₂ que en el medio MSM₁.

Por medio del método de Voltametría cíclica se logró confirmar que el consorcio de bacterias aisladas si degradaban Glifosato. Además, fue posible cuantificar la cantidad de compuesto degradado, encontrándose un porcentaje de degradación de alrededor de 61% por parte de las bacterias.

ABSTRACT

Today there are many herbicides, among them the most used is Glyphosate, whose action is characterized by broad-spectrum, non-selective post-emergence for control of a wide range of weeds. This compound acts systemically and is not metabolized by plants; is translocated generating reservoirs in the meristematic regions including roots and nodules.

Currently, with the implementation of GM crops using herbicides Glyphosate generally known as Roundup, has generated an increase in consumption due to the resistance that have this type of crops to this compound, which could cause potential problems in the biotic found in soils of these plantations. Since it can herbicide, filtered through different layers of the earth by removing him beneficial soil microorganisms, including those that act as biological control of pathogens with their movement can reach groundwater wells or lead to nearby rivers culture.

With the premise that the degradation of this organophosphate use the microbial metabolism is considered as one of the main roads, the objective of this work was to isolate bacteria capable of degrading Glyphosate. For this, three soil samples parking at ICESI University where had applied this compound were taken. Bacteria were isolated from two selective culture media, where the first bacteria used MSM₁ Glyphosate as sole carbon source and the second MSM₂ as the sole source of phosphorus. Found that the bacteria grew by 62% over the cultivation MSM₂ that in the MSM₁.

By method of cyclic voltammetry was able to confirm that the consortium of bacteria isolated if degrade Glyphosate. It was also possible to quantitate the amount of degraded compound, being a percentage degradation of about 61% by bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

El Glifosato es un compuesto organofosforado utilizado como herbicida no selectivo de amplio espectro. Al ser aplicado en hojas, inyectado en troncos y tallos, suprime su capacidad de generar aminoácidos aromáticos importantes para su crecimiento y desarrollo (Kryuchkova Y. , 2013).

El Glifosato es aplicado con el fin de terminar con la presencia de hierbas, arbustos, cultivos leñosos, frutales, viñas y viveros. Una vez ingresado a la planta, además de sus efectos mortales, llega por las raíces hasta el suelo de los cultivos donde es tardíamente inmovilizado a través de la quelación de cationes, siendo muy estable y difícil de degradar. Por otro lado, es utilizado en ciertas partes del terreno cultivado, unas veces en la línea de plantación, otras en las calles y en pre-siembra, para evitar la competencia temprana de malezas. Cuando se trata de espacios donde el enfoque no es el proceso de cultivo, como bordes de cultivos, el uso tiene por objeto mantener limpio de hierba o reducir su presencia durante ciertos periodos de tiempo. Incluso se puede recurrir a este para regular el crecimiento o como madurante para los cultivos de caña de azúcar y en cacahuates (Kogan, 2010)

Uno de los herbicidas más utilizados es conocido como Roundup, que también es aplicado generalmente en cultivos transgénicos, los cuales han sido modificados genéticamente para ser tolerantes a este compuesto. En Colombia fue aprobado por primera vez el uso de maíz transgénico en el año 2007 por el Instituto Agropecuario, ICA; por la resolución 00464 (26 feb 2007) diciendo: “por la cual se autorizan siembras de maíz con la tecnología Herculex I (TC-1507)”. Esta nueva tecnología traería consigo ventajas como precisamente ser tolerantes a herbicidas a base de Glifosato, así como también brindar protección contra plagas y mejor rendimiento en los cultivos (Company, 2014)

Sin embargo, a pesar de que el compuesto con esta nueva tecnología ya no lograría afectar directamente los cultivos, este herbicida es filtrado a través de las capas de la tierra eliminando los microorganismos beneficiosos del suelo incluyendo los que actúan como control biológico de patógenos, y debido a este movimiento puede llegar hasta pozos de aguas subterráneas o desembocar en ríos cercanos del cultivo (Hernández, 2010).

Evidencias para esto son las diferentes publicaciones que muestran que el Glifosato es nocivo para la salud, debido a su efecto gravemente tóxico sobre las células de los humanos, causando alteraciones genéticas en aquellas poblaciones víctimas del contacto de una u otra forma con este compuesto (Londoño Zapata, 2006). Es por eso que la organización mundial de la salud le ha dado una nueva clasificación al Glifosato como extremadamente tóxico (categoría I) (Nivia, 2009).

Por otro lado, se sabe que existen bacterias que presentan la capacidad de degradar el Glifosato introduciéndolo a su metabolismo, las técnicas utilizadas para este proceso se conocen como biorremediación. Este trabajo con el fin de generar nuevos conocimientos que logren aportar bases para la implementación de estrategias para la utilización de bacterias como medio de solución para la descontaminación de suelos y aguas con Glifosato, pretende lograr identificar especies bacterianas capaces de degradar Glifosato utilizando medios de cultivo selectivos para su aislamiento, así como lograr estandarizar las condiciones de crecimiento. También por medio de un método electroquímico se cuantificará el Glifosato degradado por las bacterias.

DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

1.1 Planteamiento del problema

El Glifosato fue sintetizado por primera vez por Monsanto en 1970. Desde entonces es la principal sustancia activa usada en los herbicidas comerciales más comunes en agricultura comercial y jardines pequeños, así como también para el control de malezas en líneas ferroviarias, bordes de carreteras y pavimento urbano.

Al ser un compuesto químico que actúa inhibiendo una enzima necesaria en la producción de metabolitos primarios en las plantas, ha sido utilizado ampliamente en la fumigación de cultivos ilícitos. Desde los inicios del Plan Colombia en 1999 una de sus principales herramientas para combatir los cultivos de droga en el país ha sido a partir de la aspersión aérea con Glifosato. Esta forma de lucha contra el narcotráfico es fuertemente cuestionada por su posible daño al medio ambiente y a la salud de los habitantes de la región donde se fumiga (Londoño Zapata, 2006).

De igual manera este herbicida es aplicado en cultivos transgénicos para disminuir las operaciones de labranza y de campo. Con las resoluciones 464 y 465 de 2007, se autorizó la siembra de maíz transgénico en Colombia. El problema surgido con la implementación de estos nuevos cultivos es que el Glifosato se puede acumular en las raíces donde luego es filtrado a través de la tierra, afectando por un lado a los microorganismos beneficiosos del suelo, incluidos los que actúan como control biológico de patógenos y por otro lado al ser filtrado puede llegar a pozos de agua subterráneas o a ríos cercanos del cultivo. De esta manera poblaciones cercanas de individuos son afectados debido a la implementación de esta técnica (Hernández, 2010).

Por otra parte, cuando el Glifosato es aplicado a los terrenos, este a su vez es arrastrado por el viento alterando de esta manera la vida de flores silvestres y afectando algunas especies incluso a grandes distancias del sitio asperjado. De acuerdo con la EPA y otras fuentes, el Glifosato que llega al suelo es fuertemente adsorbido, aún en suelos con bajos contenidos de arcillas y

materia orgánica. Por esto, aunque es altamente soluble en agua, se considera que es inmóvil o casi inmóvil, permaneciendo en las capas superiores del suelo (Dinham, 2009).

Se conoce que para la degradación de Glifosato, el metabolismo microbiano es una de las principales vías para hacerlo, pasando por intermediarios, como sarcosina y formaldehído, a dióxido de carbono, en el cual se detecta la mayor cantidad de radioactividad recuperada en diferentes estudios, con el ^{14}C -Glifosato radiomarcado. Se han encontrado estudios donde varias cepas bacterianas se encuentran en capacidad de descomponer y degradar el Glifosato (Dinham, 2009).

Debido a la utilidad que tienen ciertos tipos de bacterias para la degradación del Glifosato este proyecto busca encontrar medios de cultivos selectivos para aislar e identificar especies bacterianas capaces de degradar Glifosato, con el fin de generar información que pueda ser de utilidad para una potencial estrategia de biorremediación para disminuir los impactos de este herbicida en el medio ambiente.

1.2 Marco teórico y estado del arte

Qué es el Glifosato (GYP).

El Glifosato(N-(fosfonometil) glicina) es un compuesto orgánico, soluble en agua, formado por una fracción de glicina y un radical aminofosfato (*Ilustración 1*). Naturalmente se puede encontrar en su forma ácida pero es usado generalmente en su forma de sal, más comúnmente como sal de isopropilamina de Glifosato. (*Véase en anexos tabla 1*).

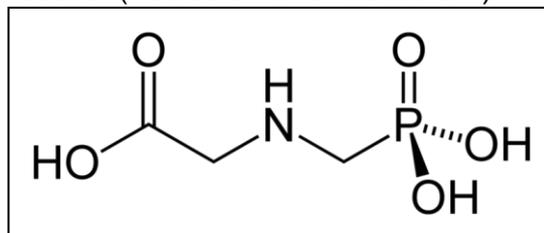


Ilustración 1 Estructura Química del Glifosato.

Se caracteriza por ser un herbicida foliar sistémico, es decir, que ingresa a la planta a través de las hojas para después migrar a otras partes del tejido vegetal afectando todos los órganos de la planta (Oirtiz, 2005).

Es un herbicida post-emergente, sistémico, de amplio espectro con una alta actividad sobre casi todas las malezas (anuales, perennes, mono o dicotiledóneas), siendo solamente resistentes aquellas variedades modificadas genéticamente (Marcelo, 2010).

Mecanismo de acción

La acción herbicida de este organofosforado luego de ser aplicado sobre el follaje es ser asimilado por las hojas y rápidamente translocado. Su acción no

selectiva de amplio espectro se debe a la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) esenciales para el crecimiento y supervivencia de la mayoría de las plantas, ya que hacen parte de la síntesis de proteínas y son precursores de hormonas de crecimiento como las auxinas (Salzar López, 2011).

En el suelo es adsorbido y degradado por microorganismos. Esto determina una escasa movilidad tanto del Glifosato como de su principal metabolito, el ácido aminometilfosónico (AMPA). Sin embargo, estudios de lixiviación y escurrimiento indican que el Glifosato puede ser transportado hacia las capas profundas del suelo debido al flujo preferencial por macroporos o hacia cursos de aguas superficiales cuando su aplicación se realiza en momentos anteriores a lluvias intensas (Sasal, 2010).

El GYP actúa inhibiendo la enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-P sintetasa (EPSP) involucrada en la vía metabólica del ácido Shikímico (Ilustración 2). La inhibición de esta vía, exclusiva de las plantas, hace que se bloquee la síntesis del corismato, el cual es un intermediario indispensable para su crecimiento y supervivencia. (Zobiolo, 2010).

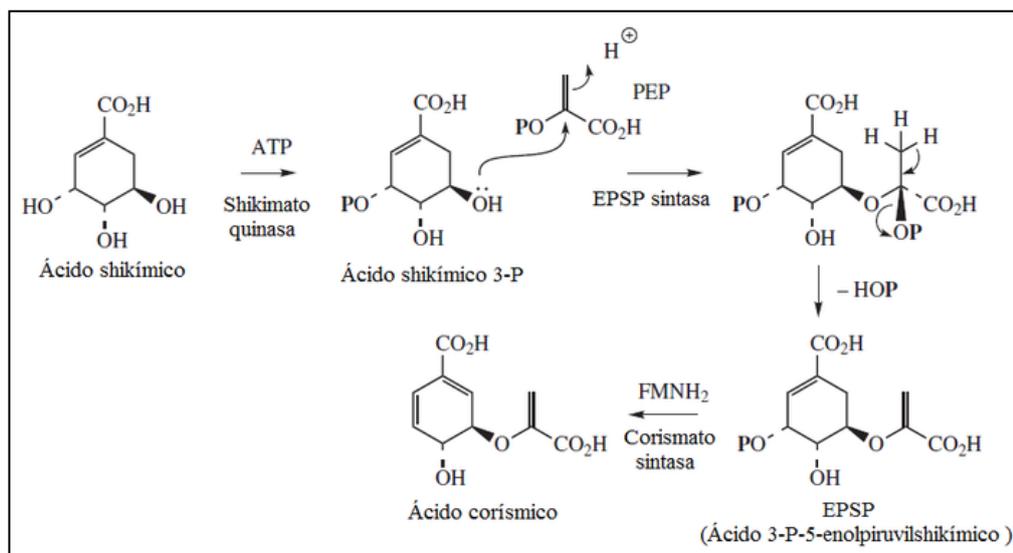


Ilustración 2Ruta metabólica donde actúa el Glifosato. (Zobiolo, 2010)

Una vez en el suelo, el Glifosato es tardíamente inmovilizado a través de la quelación de cationes, y por tanto es muy estable y no se degrada fácilmente. Sin embargo, el fósforo generalmente presente en los fertilizantes puede liberar al herbicida, haciendo que se active una vez más en el suelo (Sirinathsingji, 2012).

De igual manera el GYP inhibe la síntesis del ácido indolacético (hormona involucrada en el crecimiento celular), la clorofila y las proteínas involucradas en la síntesis de azúcares y en la desintoxicación de la planta. Como resultado, se presenta un proceso lento de muerte de la misma, que se inicia con una suspensión del crecimiento, seguida de clorosis y finalmente necrosis de los tejidos (L. Lorentz, 2011).

El Glifosato sufre biodegradación microbiana en el suelo, en sedimentos acuáticos y en el agua, y su principal metabolito es el ácido aminometilfosfónico (AMPA). En las plantas se cree que se lleva a cabo mediante dos rutas metabólicas similares a aquellas presentes en los microorganismos. La primera involucra la ruptura oxidativa del enlace C-N para producir AMPA y la otra, es la ruptura del enlace C-P por la liasa C-P para generar sarcosina. Este metabolito es fitotóxico a pesar que es considerablemente menos activo que el Glifosato (*Ilustración 3*) (Buzzo de Brum, 2010).

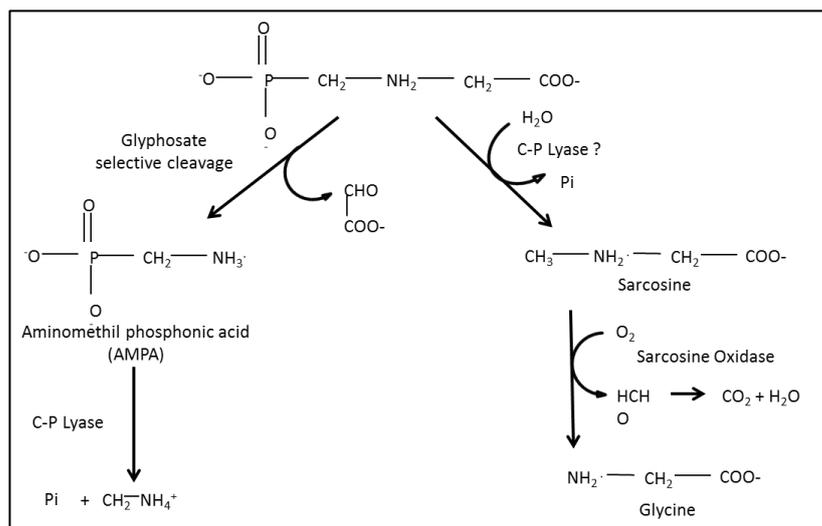


Ilustración 3 Rutas de degradación del GYP en suelos. (Buzzo de Brum, 2010)

El GYP es acumulado además en los tejidos de la planta (tallo y puntas de las raíces, las estructuras reproductivas y los nódulos de las leguminosas), pero también en las raíces de donde luego se filtra en el suelo y afecta a los microorganismos beneficiosos incluidos los que actúan como control biológico de patógenos (Bott, 2011). La consecuencia obvia es el aumento de la virulencia de los patógenos del suelo que conducen a la enfermedad de la planta (Sirinathsinghji, 2012).

A su vez este herbicida puede reducir la fotosíntesis y la absorción de agua, por la disminución de la producción de lignina, una molécula que confiere resistencia mecánica de la planta y es crucial para conducir el agua a través de los tallos de plantas. Como consecuencia de estas deficiencias nutricionales, se tiene la muerte de la planta o de lo contrario se observa un deterioro de los cultivos, no son tan productivos, y su crecimiento es más lento (Sirinathsinghji, 2012).

El Glifosato puede disminuir el contenido de minerales a través de la eliminación de organismos benéficos, incluyendo microorganismos productores de ácido indol-acético (una auxina que promueven el crecimiento), las lombrices de tierra, las asociaciones de micorrizas, la absorción de fósforo y zinc, bacterias fijadoras de nitrógeno como Bradyrhizobium, Rhizobium y organismos involucrados en el control biológico de enfermedades del suelo que reducen la absorción por las raíces de los nutrientes (Sirinathsinghji, 2012).

Efectos del Glifosato en seres vivos

Estudios realizados han demostrado que el glifosato ha sido erróneamente calificado como "toxicológicamente benigno", ya que existen reportes que evidencian que el Glifosato puede ser uno de los factores importantes en el desarrollo de múltiples enfermedades y condiciones crónicas que se han vuelto frecuentes en la actualidad. Además de autismo, estos incluyen problemas gastrointestinales tales como enfermedad inflamatoria del intestino, diarrea crónica, colitis y enfermedad de Crohn, obesidad, enfermedad cardiovascular, depresión, cáncer, caquexia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, entre otros (Samsel, 2013).

En el artículo "Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases" se reporta la capacidad que tiene el Glifosato para eliminar las bacterias que habitan en el intestino humano, además la manera cómo influye negativamente en el transporte sanguíneo del sulfato y fosfato, contribuyendo a la generación de diabetes y a enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, se describe cómo interfiere en el correcto funcionamiento de las enzimas del citocromo P450 (CYP) ocasionando deficiencias en la vitamina D3. Siendo esta la explicación del desencadenamiento de las enfermedades anteriormente mencionadas (Samsel, 2013).

Otros reportes, como el realizado por miembros del Pesticide Action Network demuestran a través de la realización de una revisión de la toxicología del glifosato e identificando efectos adversos en todas las categorías estándar de estudios toxicológicos (subcrónicos, crónicos, carcinogénicos, mutagénicos y reproductivos):

Tabla 1 Información del Glifosato. Comparación entre Monsanto e investigaciones independientes.

Afirmaciones de Monsanto	Hallazgos de Investigaciones Independientes
El Roundup posee un bajo potencial irritativo para ojos y piel, además no constituye un riesgo para la salud humana.	<ul style="list-style-type: none"> • El Roundup está entre los pesticidas más denunciados por ocasionar incidentes de envenenamiento en varios países. • El Roundup ocasiona un espectro de síntomas agudos, incluyendo eczema recurrente, problemas respiratorios, hipertensión arterial y reacciones alérgicas.
El Roundup no ocasiona ningún efecto adverso reproductivo.	<ul style="list-style-type: none"> • En ensayos de laboratorio sobre conejos el glifosato efectos dañinos duraderos sobre la calidad del esperma y el recuento espermático.
El Roundup no es mutagénico en mamíferos.	<ul style="list-style-type: none"> • En experimentos de laboratorio se observó daño en el ADN de órganos y tejidos de ratones.
El Roundup es ambientalmente seguro.	<ul style="list-style-type: none"> • En el medioambiente agrícola, el glifosato es tóxico para organismos benéficos del suelo y artrópodos predadores benéficos, e incrementa la susceptibilidad a enfermedades de los cultivos.

	<ul style="list-style-type: none"> • El uso de glifosato en forestación y agricultura genera efectos indirectos perjudiciales en pájaros y pequeños mamíferos al dañar su provisión alimenticia y su hábitat. • El uso de glifosato en zonas arables ocasiona acronecrosis o gangrena regresiva en árboles perimetrales.
El Roundup es rápidamente inactivado en el suelo y el agua.	<ul style="list-style-type: none"> • El glifosato es muy persistente en el suelo y los sedimentos. • El glifosato inhibió la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en trébol durante 120 días luego de su aplicación. • Los fertilizantes en base a fosfatos pueden inhibir la degradación en suelo del glifosato.
La transferencia genética desde cultivos de oleaginosas transgénicos es inevitable. Los cultivos Roundup Ready reducirán los niveles de utilización de herbicidas.	<ul style="list-style-type: none"> • Los cultivos tolerantes a herbicidas intensificarán e incrementarán la dependencia del uso agrícola de herbicidas más que conducir a reducciones significativas. Una variedad de herbicidas tendrá que ser reintroducida para controlar voluntarios glifosato-resistentes y malezas resistentes.

(Tabla tomada de: Impactos sanitarios y ambientales del glifosato: Las implicaciones del aumento en la utilización de glifosato en asociación con cultivos genéticamente modificados, (Buffin, 2001)

Cultivos transgénicos

Los cultivos transgénicos, son aquellos a los que con ayuda de técnicas biotecnológicas modernas se les han transferido segmentos de ADN que le confieren características deseables específicas, como lo son la resistencia a plagas, tolerancia a herbicidas o la capacidad de tolerar condiciones climáticas adversas (Chavarrías, 2009).

El primer alimento genéticamente modificado (transgénico) fue introducido en el mercado internacional a mediados de los años noventa. Desde ese momento, variedades de soya, maíz y algodón, entre muchos otros cultivos se han comercializado en diferentes áreas del mundo. Estudios realizados hasta el 2009 estiman que los cultivos transgénicos cubren aproximadamente el 4% del área cultivable global (Chavarrías, 2009).

El uso de cultivos genéticamente modificados permite, entre otras cosas, acelerar el mejoramiento genético tradicional, aumentar los rendimientos agrícolas, reducir la aplicación de pesticidas y desarrollar nuevas variedades de cultivos. Estos cambios en las prácticas agrícolas tienen como finalidad aumentar la productividad y la rentabilidad al mismo tiempo, ya que disminuyen las superficies cultivadas.

Maíz Transgénico:

Aunque el maíz es una fuente ideal de energía, la población mundial consume poco maíz en grano o maíz procesado directamente, en comparación con el consumo de ingredientes alimentarios que tienen como base el maíz. Este cereal es una excelente materia prima para la fabricación de almidón, no sólo por su precio y su disponibilidad, sino también porque es fácil extraer grandes cantidades con una gran pureza. Casi el 25% del almidón de maíz se utiliza como tal, más del 75% del almidón se utiliza en la obtención de edulcorantes y productos de fermentación, entre los que se incluyen el jarabe de maíz con alto contenido en fructosa y etanol (Mosanto, 2002).

Es por eso que compañías como Mosanto han manipulado genéticamente este cereal para mejorar sus procesos de producción en los cultivos. El maíz RR (RoundupReady) ó evento NK603 es tolerante al Glifosato, ya que dentro de su información genética se le ha insertado dos copias en tandem del gen de la enzima 3-enolpiruvil-shiquimato-5-fosfato sintasa (EPSPS), proveniente de la cepa CP4 de la bacteria del suelo *Agrobacteriumtumefaciens*. La enzima EPSPS producida en esta cepa es tolerante al herbicida (Ortega Ramírez, 2009).

Otros usos del Glifosato:

En el cultivo de caña de azúcar, el Glifosato es utilizado a bajas concentraciones como madurante ya que le confiere a la planta ciertos beneficios. En esta planta actúa sobre la invertasa ácida (beta-fructosidasa), enzima necesaria para degradar la sacarosa, en glucosa y fructosa, las cuales son utilizadas en el crecimiento del cultivo. De esta manera se afecta la elongación de los tallos, el mantenimiento de la actividad fotosintética por cierto tiempo, logrando que la sacarosa no sea degradada, aumentando el contenido de esta en las cosechas. Este efecto se concentra en el tercio superior del tallo (Lemus Grijalva, 2007).

Con esta técnica es posible reducir los costos de transporte debido a la relación toneladas de caña y kilogramos de azúcar, porque se transporta menos basura en la caña y más contenido de sacarosa. Se secan las hojas de la caña produciendo mejor quema, reduce la producción de las hojas lo que favorece en la recuperación de sacarosa en las fábricas. Incrementa la sacarosa y la pureza del jugo, elevando la productividad del ingenio, por la molienda de caña de mejor calidad. Entre otros muchos beneficios (Lemus Grijalva, 2007).

Por otro lado la interferencia ejercida por las malezas es uno de los factores que pueden reducir el crecimiento de un cultivo y así comprometer su productividad. Por eso el Glifosato es un herbicida ampliamente utilizado para el control de malezas de gran variedad de cultivos, un ejemplo es el del eucalipto, aplicado en el área total para la desecación antes de la siembra, para controlar el rebrote y para controlar malezas entre las hileras de plantas. La inhibición de la EPSPS anteriormente explicada, también conduce a la acumulación de shiquimato en tejidos de la planta, permitiendo el uso de

Glifosato como un indicador de la sensibilidad (Campos, 2012).

En diferentes tipos de cultivos como en maíz, soja, el café y cítricos, este herbicida puede generar "Hormesis", esto se conoce como un comportamiento en el que un rasgo biológico es estimulado por bajas dosis de un compuesto y se inhibe por altas dosis de un mismo compuesto (Campos, 2012). Donde estudios confirman que el efecto de bajas dosis de Glifosato se evidencia un crecimiento positivo en las plantas, se da aumento de la biomasa, el crecimiento de los brotes y el sistema radicular, así como aumentos en la absorción y la acumulación de fósforo en las hojas (Wagner, 2003).

Métodos para la Cuantificación de Glifosato

A pesar de la magnitud de su aplicación, el Glifosato es uno de los herbicidas menos monitoreado, pues su determinación y cuantificación no es sencilla. Debido a sus propiedades físicas y químicas, tales como su baja volatilidad, alta solubilidad en agua, baja solubilidad en compuestos orgánicos, su bajo peso molecular, su ausencia de grupos cromóforos y gran capacidad para formar complejos muy estables con iones metálicos, lo hacen difícil de analizar usando técnicas de cromatografía de gases o líquidos con detectores tradicionales sin derivatización (Rasul, 2009).

Los métodos analíticos para monitorear el Glifosato están basados en técnicas cromatográficas clásicas, cromatografía de gases y líquida con derivatización pre o post columna, también espectrometría de masas o espectrometría de masas en tándem, especialmente mediante el uso de ionización por electrospray, debido a que son muy polares y fácilmente ionizables por esta técnica, aunque son pocos los métodos encontrados (A.M. Botero-Coy, 2013). En la mayoría de los trabajos publicados, se han empleado procedimientos de derivatización pre y postcolumna para analizar el compuesto por detección de fluorescencia. Todas estas metodologías son costosas, usan solventes tóxicos y son altamente especializadas (Rasul, 2009).

A causa de que los procesos de derivatización resultan ser tóxicos y poco estables también se han realizado estudios por cromatografía líquida de fase reversa acoplada con espectrometría de masas en tándem con electronebulización para la cuantificación de estos compuestos en diferentes tipos de muestras, donde no realizan derivatizaciones, utilizando curvas de calibración preparadas a partir de un estándar de Glifosato (Martins, 2011).

Por otro lado, la Voltametría Cíclica es un método electroquímico, que proporciona información sobre un analito a partir de la medida de corriente en función de un potencial aplicado. Se basa en la intensidad de corriente que desarrolla en una celda electroquímica. La voltametría cíclica, es una técnica de gran utilidad para estudios de procesos redox, así como para el estudio de intermediarios de reacción, donde se analiza la variación de la corriente a medida que se modifica el potencial. En este método, el analito se coloca

dentro de un electrodo y luego se remueve electroquímicamente, monitoreando la corriente en función del potencial aplicado (Harris, 2007).

Esta técnica consiste en la aplicación de un barrido lineal de potencial al electrodo de trabajo tanto en sentido directo como en el inverso, realizando lo que se denomina una onda triangular (Ilustración 4 (excitación)), una vez alcanzado el potencial máximo, se lleva a cabo un nuevo barrido en sentido contrario hasta alcanzar el potencial inicial. El cambio constante del potencial en el tiempo se le conoce como velocidad de barrido. Como respuesta se genera un voltamograma cíclico (Ilustración 4 (respuesta)), el cual es la relación entre la corriente y el potencial, con el que se puede establecer los potenciales a los cuales los procesos de oxidación y reducción ocurren.

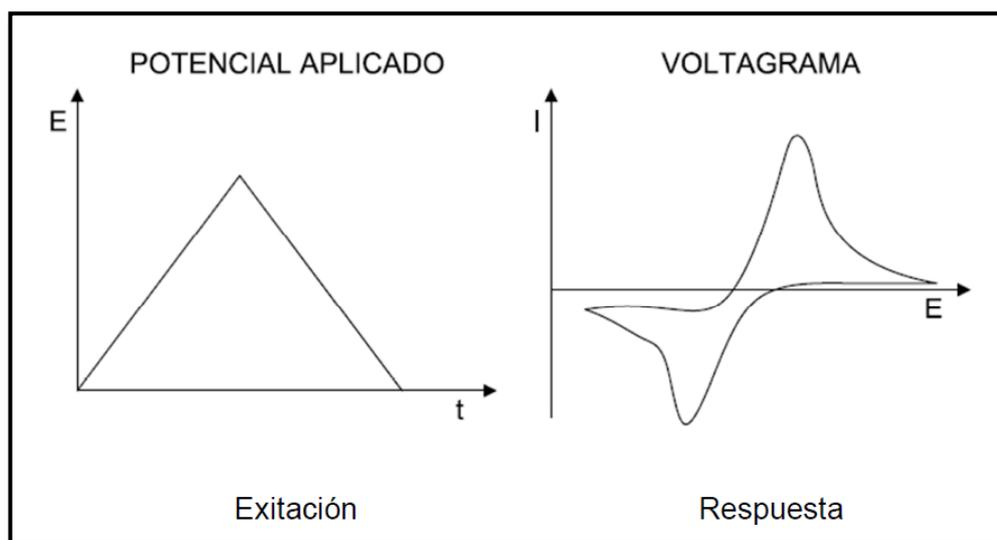


Ilustración 4 Excitación y respuesta de la Voltametría Cíclica.

La electroquímica es un área de la química que puede dar información respecto a la interacción de este herbicida con una superficie y además, bajo las condiciones adecuadas podría llegar a usarse como herramienta analítica para su cuantificación. Aquellos procesos tales como adsorción, formación de intermediarios y reacciones redox de este compuesto pueden estudiarse también por medio de esta técnica. No obstante, la electroquímica del Glifosato no se ha investigado en profundidad, encontrándose solo unas pocas referencias en las cuales se lleva a cabo la determinación de este herbicida sobre electrodos de oro en condiciones hidrodinámicas sin y con previa derivatización. Entre estos trabajos, se encuentra la cuantificación de Glifosato en aguas naturales por voltametría de pulso diferencial (DPV) y voltametría de onda cuadrada (SWV) luego de derivatizar el Glifosato para producir su derivado nitrosado (Sierra, 2008).

Este tipo de procedimientos poseen un problema debido a que el principal metabolito del Glifosato, el ácido aminometilfosfórico (AMPA), no puede ser nitrosado, y por lo tanto en los casos donde el objetivo sea la cuantificación de este tipo de compuestos no logra ser detectado empleando (DPV) o (SWV);

esto implica que por estas técnicas no es posible una cuantificación real de los residuos del Glifosato en muestras naturales. El Glifosato también puede ser detectado sobre un electrodo de oro, luego de ser separado por medio de cromatografía de intercambio iónico, con una técnica cronoamperométrica conocida como detección amperométrica por pulsos (PAD), es decir, que se trata de una técnica cromatográfica clásica acoplada a un detector electroquímico (Sierra, 2008).

Existe información bibliográfica acerca de estudios sobre el comportamiento de electrodos de cobre y níquel en medio alcalino, donde han sido evaluados como ánodos en la oxidación de compuestos orgánicos, para lograr obtener señales de oxidación para moléculas con estructura química similar al Glifosato. Se ha usado ampliamente desde hace algunos años electrodos de cobre con el objetivo de detectar moléculas tales como, aminoácidos, proteínas, aniones inorgánicos, alcoholes, carbohidratos, en especial con la combinación de técnicas cromatográficas y de flujo. Con esta técnica el compuesto a analizar puede formar complejos con los iones Cu^{+2} generando que la concentración de dicho compuesto influya en la velocidad de generación del cobre. Por otro lado, se ha analizado el caso en que el analito es oxidado electroquímicamente en la superficie del electrodo en medio alcalino, este proceso involucra la formación de especies catalíticas de cobre. Generalmente, cuando se utiliza el cobre para las determinaciones, por lo general el electrodo tiene que ser pre-tratado catódicamente, de tal manera que la superficie este limpia y se genere una capa de cobre activa, seguidamente se polariza a un potencial positivo en pH básico para la formación de una capa de oxido/hidróxido. El resultado del volumen de la corriente monitoreada en el electrodo puede depender de varios parámetros tanto termodinámicos como cinéticos, entre ellos la estabilidad del complejo analito-ión cúprico, la velocidad de formación del complejo, la velocidad de formación y disolución de la capa de oxido/hidróxido, la velocidad de transporte del analito (Pavón, 2005).

Para el análisis con Glifosato, se tiene en cuenta su gran afinidad por los iones metálicos de transición, por su composición química al conformarse por sus tres grupos funcionales: amino, carboxilato y fosfonato. Con esto se esperaría que adsorbiese fácilmente sobre electrodos de cobre y níquel, permitiendo su electrooxidación y/o acomplejamiento (Sierra, 2008).

Edgar Virgilio y colaboradores hablan en su trabajo acerca de la interacción electroquímica del Glifosato con electrodos de cobre y níquel, su intención fue evaluar la presencia de una señal analítica para el herbicida, pretendiendo obtener nueva información del comportamiento electroquímico del Glifosato sobre las superficies de estos electrodos, mostrando así el desarrollo de un método de detección alternativo a las técnicas de análisis instrumental.

Biorremediación

La contaminación de los suelos y en general del medio ambiente, en muchas ocasiones se debe por agentes contaminantes metálicos pesados y tóxicos

difíciles de extraer o de transformarse en productos inocuos. La biorremediación es una de las técnicas de gran impacto utilizadas para la disminución de este problema. Este proceso se conoce como un proceso tecnológico que implica el uso de organismos vivos (plantas, algas, hongos y bacterias) para absorber, degradar o transformar los contaminantes y retirarlos, inactivarlos o atenuar su efecto en suelo, agua y aire. (Bhatnagar, 2013).

Todos los contaminantes poseen características que los hacen capaces de perturbar el medio ambiente y provocar daño a la salud humana y del resto del planeta. Crear estrategias de biorremediación para eliminarlos es el nuevo camino dentro del contexto biotecnológico. Existen grupos de compuestos especialmente peligrosos para el hombre en los que la biorremediación ha logrado importantes avances (Ghosh, 2010).

El proceso de biorremediación mejora la velocidad de la degradación de componentes tóxicos utilizando la macrobiótica natural. Este proceso se puede realizar mediante el uso de microorganismos nativos o a partir de microorganismos extraídos de medios de cultivo enriquecidos que tienen características específicas que permiten la degradación de estos compuestos en lapsos de tiempos muy cortos (Bhatnagar, 2013).

Estudios reportan cómo a través de este tipo de técnicas ha sido posible remover ciertos contaminantes procedentes de procesos como la combustión de combustibles fósiles, la incineración de residuos y subproductos de procesos industriales que incluyen la gasificación del carbón, producción de metales, refinación de petróleo, componente de conservantes de madera, ahumados, vehículos y estufas de leña (Bisht, 2014).

Estas actividades industriales liberan enormes cantidades de hidrocarburos de petróleo (APS), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), hidrocarburos halogenados, pesticidas, disolventes, metales y sal, causando daño perjudicial sobre los ecosistemas y los seres humanos. Y es a través de procesos de biorremediación como se ha tratado de disminuirlos, con el uso sinérgico de plantas y microorganismos para limpiar los suelos contaminado por HAP donde la rizosfera de la planta proporciona un mejor entorno para las bacterias logrando que estas sobrevivan y puedan proliferar. Como resultado del metabolismo de estas bacterias es generado ciertos compuestos como ácido indolacético, sideróforos, ácido cianhídrico, 1-aminociclopropano-1-carboxilato, menos tóxicos que los generados por las actividades industriales (Bisht, 2014).

Por otro lado se encuentra la producción de tabaco, la cual provoca contaminación de los recursos naturales, pérdida de biodiversidad, incendios forestales, deforestación de bosques y selvas, aumento del cambio climático y la mala calidad del aire urbano, señala un informe del Centro para el Control del Tabaco de la Organización Mundial de la Salud (OMS). La nicotina es su principal componente, esta se puede convertir en una variedad de metabolitos intermedios más tóxicos, tales como N'-nitrosornicotina, 4- (metilnitrosamino) -1- (3-piridil) -1-butanona, la cotinina, y N-nitrosamina. Debido a su alta solubilidad en agua, puede penetrarse fácilmente en los suelos, lo que puede

afectar su estructura ecológica y contaminar el agua subterránea (Wang, 2012).

Debido a esta problemática se han reportado estudios de biorremediación para estas zonas mediante la adición de bacterias capaces de degradar nicotina. Estos microorganismos pueden crecer con la nicotina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. Las especies dominantes de biodegradación reportados pertenecen al género *Arthrobacter* y de *Pseudomonas*, las cepas representativas incluyen *Arthrobacter nicotinophagum*, *oxidans Arthrobacter*, *Arthrobacter ureafaciens*, *nicotinovorans Arthrobacter*, *Pseudomonas sp. HF-1*, *Pseudomonas putida S16*, y *Pseudomonas sp. HZN6* (Wang, 2012).

Debido a la gran variedad de plaguicidas utilizados, se hace complicado el producir un método único para la eliminación de pesticidas en el agua y en aguas residuales. Por lo tanto, hay varios procesos de tratamiento para eliminarlos como lo es la biodegradación. Donde como regla general, el tratamiento biológico es más económico que los métodos de reparación fisicoquímicas por su rentabilidad y la capacidad de lograr una degradación completa de los contaminantes orgánicos (Choong, 2011).

Los tratamientos biológicos como este, emplea capacidades metabólicas importantes de los microorganismos para transformar los contaminantes orgánicos en compuestos menos peligrosos o inofensivos para el medio ambiente. Un estudio realizado, donde se pretendía comparar el potencial de degradación de las bacterias encontradas en una muestra de lodo y una plantación de palma de aceite contaminada con Glifosato, se encontró que al aislar las bacterias capaces de degradar Glifosato, dichos microorganismos podían utilizar Glifosato como fuente de carbono, conduciendo a la producción de ácido aminometilfosfónico (AMPA) o como fuente de fósforo, produciendo sarcosina y luego glicina. Lo cual podría representar una estrategia clave para la biorremediación de suelos contaminados con este herbicida (Choong, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Identificar especies bacterianas de los géneros: *Pseudomona*, *Bacillus* y *Flavobacterium* capaces de degradar Glifosato

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Estandarizar las condiciones óptimas para el medio de cultivo para aislar bacterias degradadoras de Glifosato.
- 2.2.2 Identificar las bacterias aisladas en los medios selectivos a partir de pruebas moleculares.
- 2.2.3 Determinar la cantidad degradada de Glifosato por parte de las bacterias aisladas por medio de la técnica electroquímica: Voltametría Cíclica.

3. METODOLOGÍA

3.1 Obtención de las muestras

Las bacterias objeto de estudio en este proyecto se tomaron a partir de muestras en el suelo del parqueadero Charria de la universidad Icesi. Debido a que en investigaciones anteriores se identificó la presencia de bacterias degradadoras de Glifosato dentro de este espacio. El muestreo fue totalmente al azar y se tomaron a 10 cm de profundidad.

Suelo 1 (M₁): Muestra de un suelo al cual se le había aplicado Glifosato. El aspecto de la tierra era seca y árida (*Véase en Anexos, Ilustración 12*).

Suelo 2(M₂): Muestra de un suelo al cual se le había aplicado Glifosato. El aspecto de la tierra era húmeda y con algo de vegetación (*Véase en Anexos, Ilustración 13*).

Suelo 3(M₃): Muestra de restos de tierra a la cual se le había aplicado Glifosato ubicada en un canal de agua seco (*Véase en Anexos, Ilustración 14*).

Cada una de las muestras fue recolectada en bolsas estériles, posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente hasta su respectivo análisis (*Véase en Anexos, Ilustración 15*).

Para preparar los medios de cultivo previamente cada muestra se seco durante 24 horas y luego con ayuda de una malla se tamizó la tierra para eliminar componentes no deseados (*Véase en Anexos, Ilustración 16*).

3.2 Aislamiento mediante el uso de medios de cultivo enriquecidos.

Para obtener un crecimiento bacteriano adecuado en un medio de cultivo artificial, éste debe reunir una serie de condiciones adecuadas tales como: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes, los factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante (Pérez, 2002).

Por otro lado, se llama enriquecimiento a cualquier cultivo en medio líquido, que resulte en un incremento en el número de un tipo dado de microorganismo en relación con el número de otros tipos de microorganismos que puedan estar en el inóculo. Un medio de enriquecimiento puede contener sustancias que favorezcan el crecimiento del microorganismo de interés o que inhiban el crecimiento de los otros tipos de microorganismos presentes (Santambrosio, 2009).

Para ello, se utilizaron dos medios de cultivos selectivos siguiendo el protocolo de procedimiento del artículo “Isolation and characterization of glyphosate-degrading bacteria from different soils of Algeria” (Oued, 2013). El primero como fuente única de carbono (MSM₁) y el segundo como única fuente de fósforo (MSM₂) con pH final de 7 (Vease en anexos *Tabla 2 y 3*).

Inicialmente, se realizó un primer cultivo en medio líquido, para ello se tomaron 5g de cada una de las muestras (por duplicado); M₁, M₂ y M₃, se llevaron a un erlenmeyer esterilizado de 250mL con 95mL de cada uno de los medios líquidos, con la adición de Glifosato a una concentración final de 0.5g/L y se incubaron en oscuridad a 30°C bajo agitación constante (150rpm) durante 7 días (Incubación No. 1).

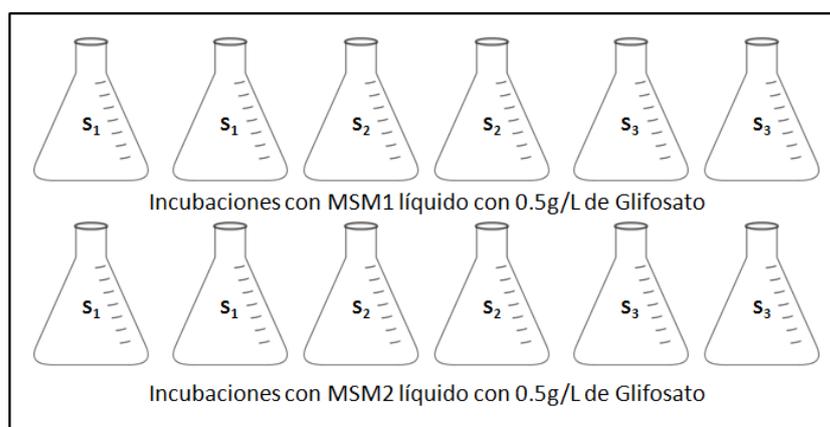


Ilustración 5 Esquema de la Incubación No.1 con Concentración final de 0.5g/L de Glifosato.

Pasados los 7 días se tomaron 5mL de cada uno de los erlenmeyers y se transfirieron a otro erlenmeyer esterilizado con otros 95mL de cada uno de los medios líquidos, con la adición de Glifosato a una concentración final de 1g/L y se incubaron en oscuridad a 30°C bajo agitación constante (150rpm) durante 7 días (Incubación No. 2). Este mismo procedimiento fue realizado para concentraciones finales de Glifosato de 3, 6, 12 y 15g/L, completando un total de 6 incubaciones.

Para la adición de Glifosato en cada uno de los medios de cultivo se calculó la cantidad necesaria de Glifosato a partir de la concentración reportada en la etiqueta en la muestra comercial, para ello se tuvo en cuenta que la cantidad preparada de cada uno de los medios fue de 1L:

Concentración de Glifosato en la muestra comercial: 363g/L

Para 0,5g/L:

$$\frac{1000\text{mL} \times 0,5 \frac{\text{g}}{\text{L}}}{363 \frac{\text{g}}{\text{L}}} = \text{Volumen de Glifosato}$$

$$1,37\text{mL} = \text{Volumen de Glifosato}$$



Ilustración 6 Incubación de la muestra

3.2.1 Técnica de siembra por dilución en serie

Con el fin de obtener colonias aisladas para su posterior caracterización, se utilizó el método de siembra por dilución en serie para obtener diluciones de 10^{-9} . Esto se logró tomando 1 mL de cada uno de los erlenmeyer de la incubación No.1 y se diluyeron en 10 mL de agua destilada. Posteriormente, se tomó 1 mL de la solución anterior y disolvió en 9 mL de agua destilada. Este último paso se repitió hasta alcanzar una dilución de 10^{-9} . (Véase en anexos, *Ilustración 4*). Este proceso se realizó semana a semana para las siguientes incubaciones (Incubaciones No. 3, 4, 5 y 6)

De cada dilución se tomó 1 mL y se sembró en cajas de Petrí que contenían los mismos medios (MSM_1 - MSM_2) y 18 g/L de agar-agar. Las cajas se incubaron a $30^{\circ}C$ hasta observar la presencia de bacterias.

3.3 Preservación de las bacterias

Las colonias de las placas con las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} de la incubación No.6 para el medio MSM_2 y la incubación No.5 para el medio MSM_1 fueron criopreservadas. Para esto se adicionaron 500 μL de un medio enriquecido (ME) pH7 (Véase anexos Tabla 4) a las placas y se frotaron con una aza de vidrio en forma de L. Los 500 μL con los microorganismos fueron mezclados con 500 μL de glicerol al 50% en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Después de homogenizar completamente se guardaron a $-80^{\circ}C$.

3.4 Cuantificación del Glifosato degradado

Los experimentos electroquímicos se realizaron con un Potenciostato (PG-TEKCORR 4.1). Las medidas se tomaron en una celda con una configuración de tres electrodos. El primero, un contra electrodo de acero inoxidable, el segundo un electrodo de referencia de plata recubierto con cloruro de plata Ag/AgCl y el tercero el electrodo de trabajo de platino, sometido a un trabajo previo de limpieza. Para las mediciones se estableció una velocidad de 100mV/s entre -1600 a 0mV. Los electrodos fueron sumergidos en las

soluciones siempre yendo de la solución más diluida a la más concentrada. Todos los experimentos fueron efectuados a temperatura ambiente y el pH de todas las soluciones fue ajustado en un intervalo entre 2,0 y 3,0.

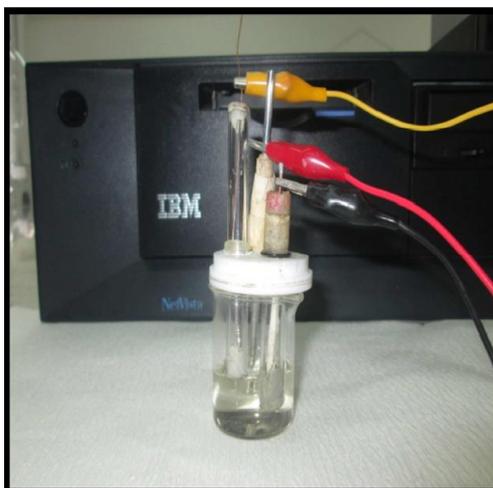


Ilustración 7 Celda Electroquímica para Identificación y cuantificación del Glifosato degradado

3.4.1 Limpieza del electrodo

El electrodo de trabajo (electrodo de platino) fue sometido a un tratamiento de limpieza antes de cada medición electroquímica, donde primeramente se lavó con agua desionizada y seguido de un baño ultrasónico durante 2 minutos en ácido perclórico: agua (1:1) y luego 2 minutos en isopropanol: agua (1:1). Luego se evaluó el procedimiento de limpieza tomando el voltamograma del metal en su medio de trabajo, que para el platino es en ácido perclórico entre un rango de pH 2,0 y 3,0.

Se encontró muy importante para la reproducibilidad de las medidas asegurar el rango de pH de las soluciones y que en el momento de la medición el electrodo no tocara ninguno de los otros electrodos y estuviese bien limpio.

3.4.2 Curva de calibración

Se preparó una solución patrón de 0.01M de GYP en ácido perclórico (Volumen de 50mL). Se realizó una curva de calibración (R^2 de 0,991. Véase en anexos Gráfica 11), utilizando soluciones patrones de GYP con concentraciones desde 5 a 150 μ M (10mL fue el volumen de cada solución).

3.4.3 Tratamiento de las muestras

Preparación muestras para cuantificación de GYP degradado: De cada una de las muestras crio-preservadas se tomó una cantidad suficiente para proliferar de nuevo el crecimiento bacteriano en medio enriquecido (Véase anexos Tabla 4). Al cabo de tres días, cada una fue transferida a un erlenmeyer

con 100mL de MSM₁ y MSM₂ con una concentración final de Glifosato de 15g/L. Fueron dejadas en incubación por siete días a 30°C a 150rpm.

Las bacterias incubadas por siete días con Glifosato en medio líquido fueron centrifugadas a 4000rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue almacenado en tubos falcon hasta el momento de su análisis.

Para el análisis se realizaron dos diluciones, la primera se tomaron 150µL en 10mL y luego 1mL en 10mL con ácido perclórico. Esto se llevó a cabo para las muestras M2 y M3 de cada uno de los medios, para un total de cuatro preparaciones.

Preparación de las muestras de Glifosato comercial y medios sin bacterias: Con el fin de realizar las mediciones del Glifosato comercial y compararlo con el Glifosato encontrado en cada uno de los medios antes de la incubación y luego de ella, se tomó una alícuota de tal manera que la concentración final para cada uno se encontrara a 0.01M y se llevó a volumen con ácido perclórico pH 2,2. Obteniendo un total de tres soluciones: Glifosato comercial, medio MSM₁ y medio MSM₂

3.4.4 Determinación del porcentaje de degradación

El porcentaje de degradación se halló utilizando la siguiente fórmula:

$$degradación(\%) = \frac{concentración\ inicial - concentración\ residual}{concentración\ inicial} \times 100$$

Concentración inicial de Glifosato en g/L

Concentración residual de Glifosato en g/L

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento mediante el uso de medios de cultivo enriquecidos

A partir de los medios de cultivo selectivos se logró el crecimiento bacteriano en cada una de las incubaciones. Para la primera concentración, no se realizó el crecimiento de las bacterias en las cajas petrí debido a que se esperaba que en esta concentración de 0.5g/L se diera una etapa de adaptación en las bacterias.

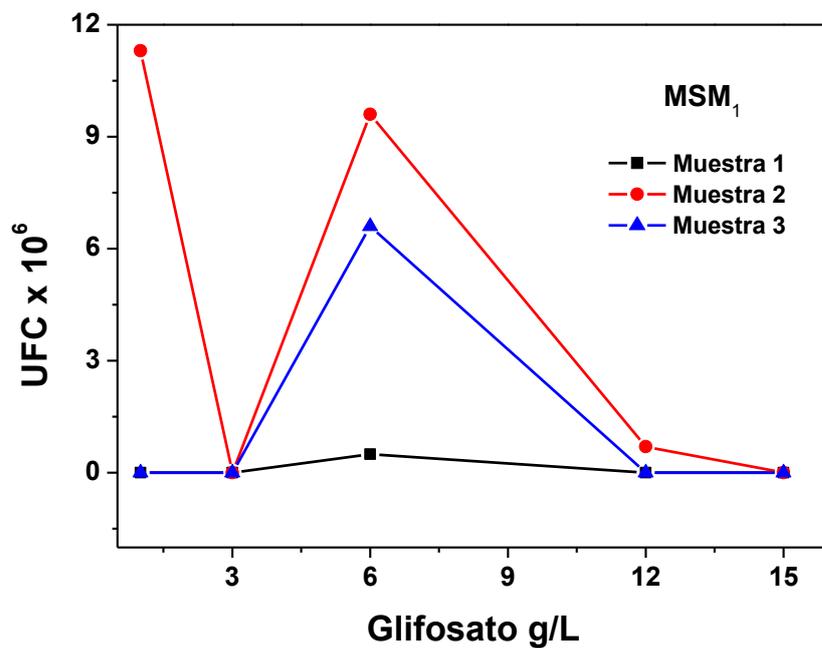
Con el objetivo de obtener colonias aisladas para su posterior análisis se realizaron varias diluciones hasta 10^{-9} , las cuales fueron plaqueadas en la incubación No. 2. Pero al momento de revisar las placas se observó que hasta 10^{-5} se lograba identificar la presencia de las unidades formadoras de colonias (UFC). Debido a esto para las posteriores incubaciones fue hasta este valor que se realizaron las diluciones y así mismo las placas.

Para graficar los resultados obtenidos se usó la dilución 10^{-5} , ya que en estas placas era donde se obtenía colonias aisladas y era posible contar con mayor facilidad las UFC. Durante el proceso de incubación con los dos medios selectivos, se observaron tendencias diferentes para cada uno de ellos.

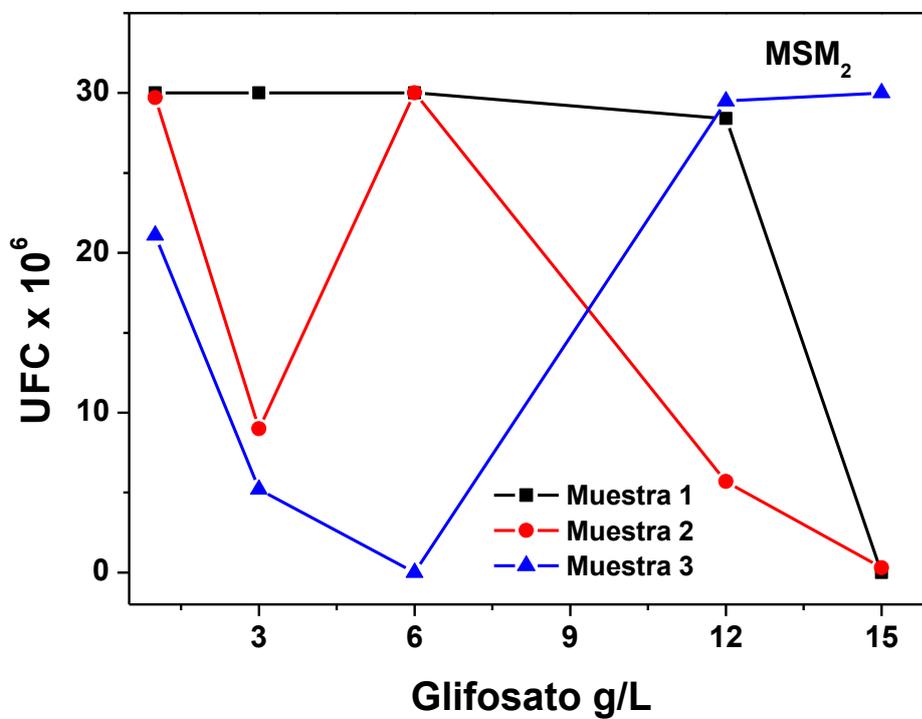
Se observó que con el medio MSM_1 donde el Glifosato era la única fuente de carbono, el crecimiento bacteriano fue un 62% menor en comparación con el medio MSM_2 . En la gráfica 1 se puede apreciar que inicialmente a concentraciones inferiores a 3g/L el crecimiento de colonias visibles fue de un cero por ciento por lo tanto no se logró identificar visiblemente alguna colonia en las placas para el caso de las muestras M_1 y M_3 o en el caso de la muestra M_2 donde el crecimiento fue de un 37% en comparación con en el medio MSM_2 (Gráfica 2).

En el caso donde el Glifosato actuó como única fuente de fósforo (medio selectivo MSM_2) se logró identificar de manera visible gran cantidad de unidades formadoras de colonias. La gráfica 2 muestra que para el caso de la muestra M_1 el número de UFC se mantuvo constante hasta una concentración de 6g/L de Glifosato. Sin embargo, para la muestra M_2 al llegar a 3g/L el crecimiento disminuye para luego aumentar en 6g/L y con la muestra M_3 disminuye progresivamente hasta 6g/L.

Finalmente, a concentraciones más altas, por encima de 6g/L el comportamiento del crecimiento fue igual para los dos medios selectivos, MSM_1 y MSM_2 . Las bacterias en este punto comenzaron a disminuir considerablemente, hasta llegar incluso para algunos casos a no lograr evidenciar colonias visibles. A diferencia de un solo caso, muestra M_3 donde llegó a aumentarse el crecimiento para luego mantener constante.



Gráfica 1 Crecimiento bacteriano en el medio MSM₁ al cabo de 6 días de incubación.



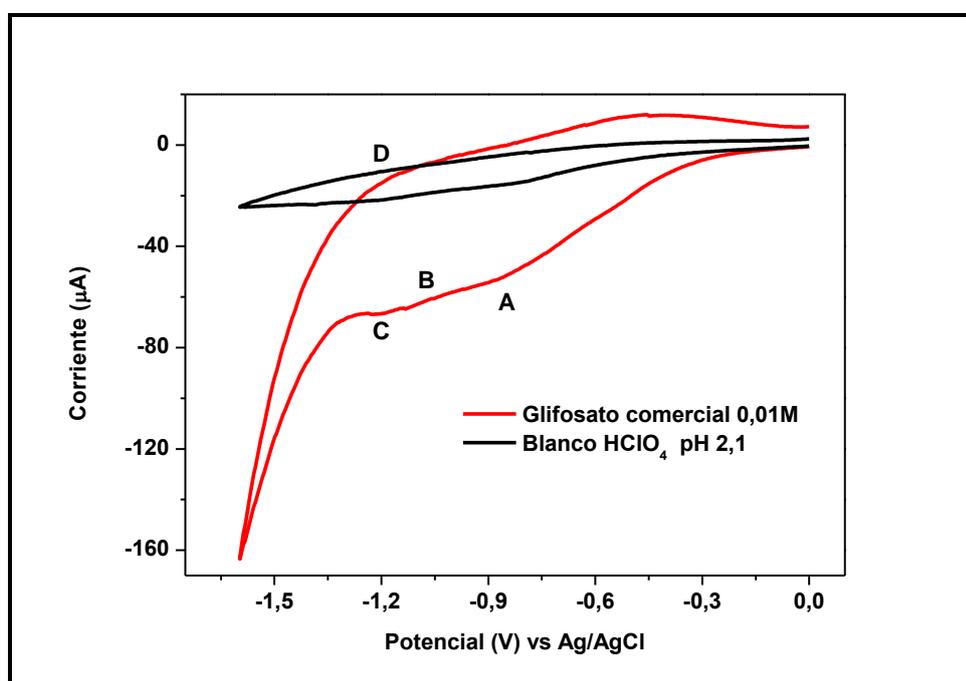
Gráfica 2 Crecimiento de las bacterias en el medio MSM₂ al cabo de 6 días de incubación.

4.2 Cuantificación del Glifosato degradado

Para lograr cuantificar el Glifosato degradado por las bacterias aisladas en este proyecto, se utilizó la técnica electroquímica de voltametría cíclica. La detección de este compuesto empleando un electrodo de platino procede mediante dos mecanismos, el primero involucra la reducción electro-catalítica del analito en un medio fuertemente ácido seguido de un proceso de acomplejamiento entre los iones de platino y el analito.

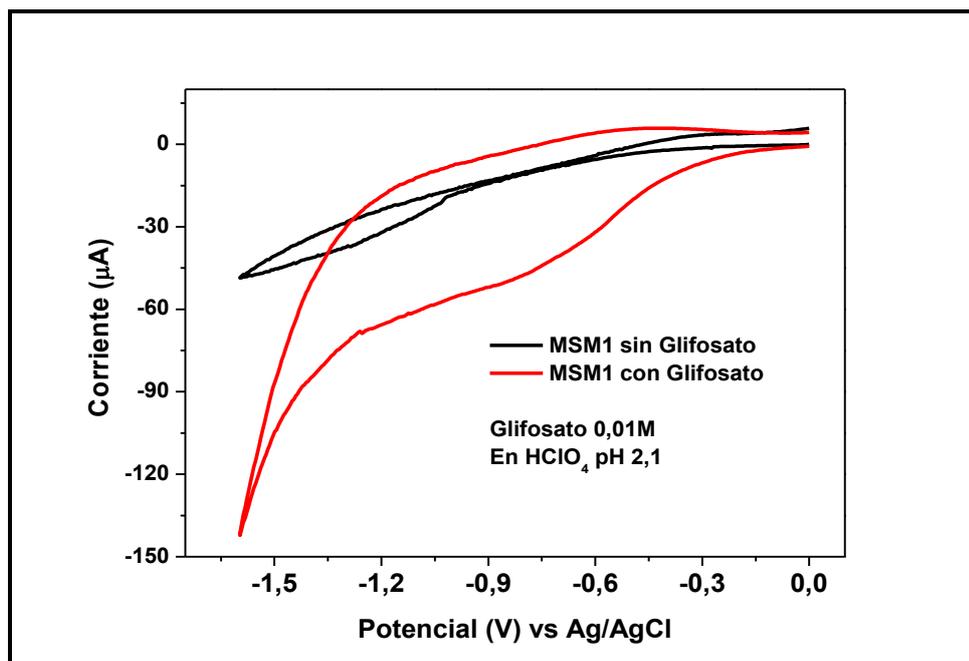
A consecuencia de que el GYP es una molécula no electroattractiva a los potenciales accesibles, fue necesario utilizar procedimientos indirectos como la modificación de la superficie electródica. En la gráfica 3 se logra observar la respuesta ciclovoltamétrica de este compuesto en el electrodo de Pt. Se evidencia una señal analítica (-0,9V) claramente definida del complejo Pt-GYP formado. La respuesta voltamétrica de glifosato en Pt se ve influenciada por el electrodo soporte, electrodo de trabajo y pH como se explicará a continuación.

Inicialmente, se realizó una lectura del Glifosato comercial 0.01M en ácido perclórico versus una solución blanco compuesta únicamente de ácido perclórico (gráfica 3). Con este resultado se encontró que a alrededor de un potencial de -0.9V aparece la respuesta característica del Glifosato con una corriente alrededor de -60 μ A.

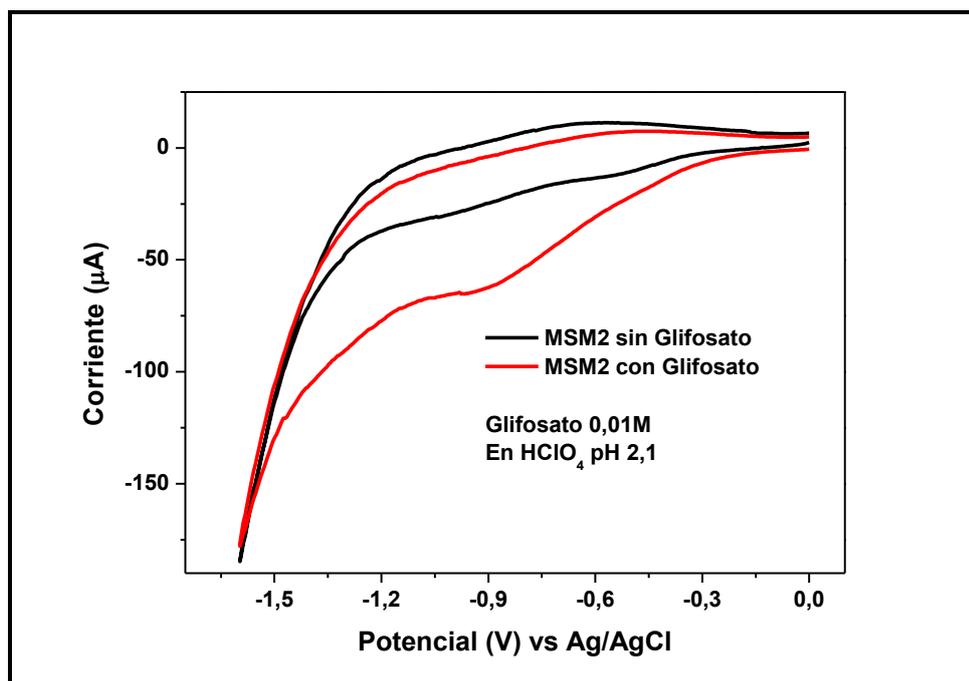


Gráfica 3 Voltamograma cíclico del Glifosato comercial.

Seguidamente se realizó la lectura de cada uno de los medios MSM₁ (gráfica 4) y MSM₂ (gráfica 5) con y sin Glifosato para establecer la presencia del herbicida en cada uno de los medios con la información encontrada con la muestra comercial.

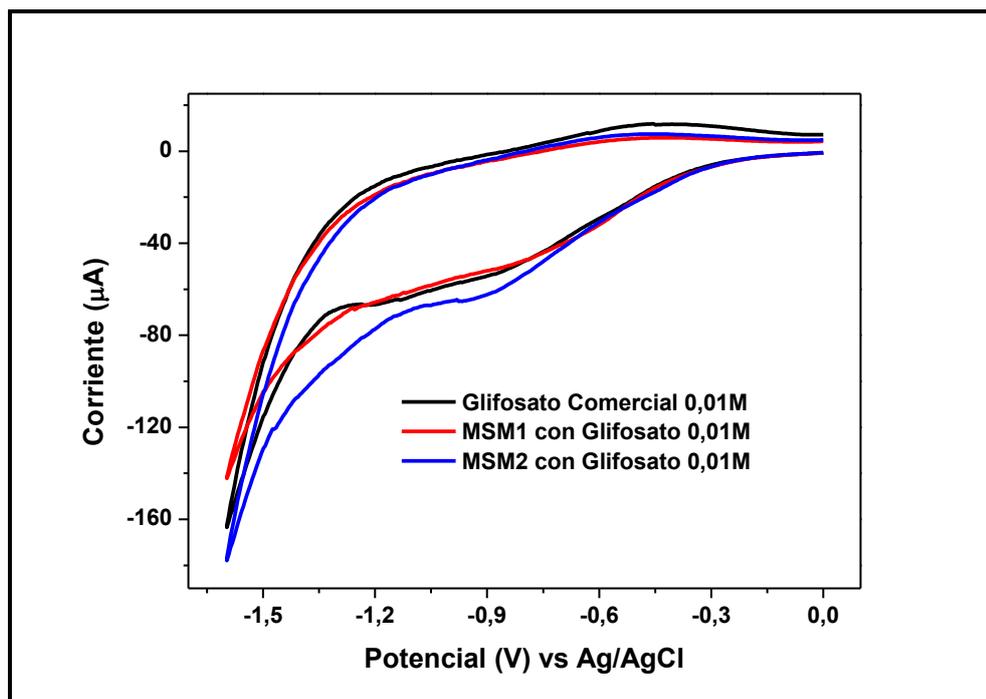


Gráfica 4 Voltamograma cíclico del medio MSM₁ con y sin Glifosato comercial.



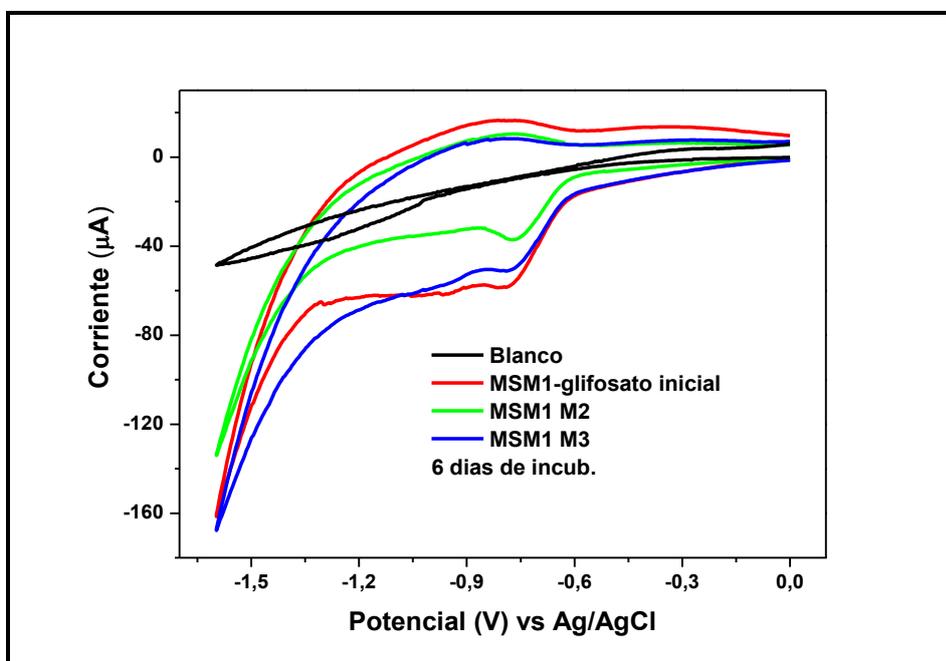
Gráfica 5 Voltamograma cíclico del medio MSM₂ con y sin Glifosato comercial.

Con estos resultados se realizó la comparación entre las tres muestras con el compuesto a una concentración inicial de 15g/L en un mismo voltamograma (gráfica 6). Finalmente, en un voltamograma se corrieron las muestras M2, M3 con el mismo medio luego de pasados los 6 días de incubación y a una concentración inicial del herbicida y el Glifosato comercial (gráfica 7 y 8).

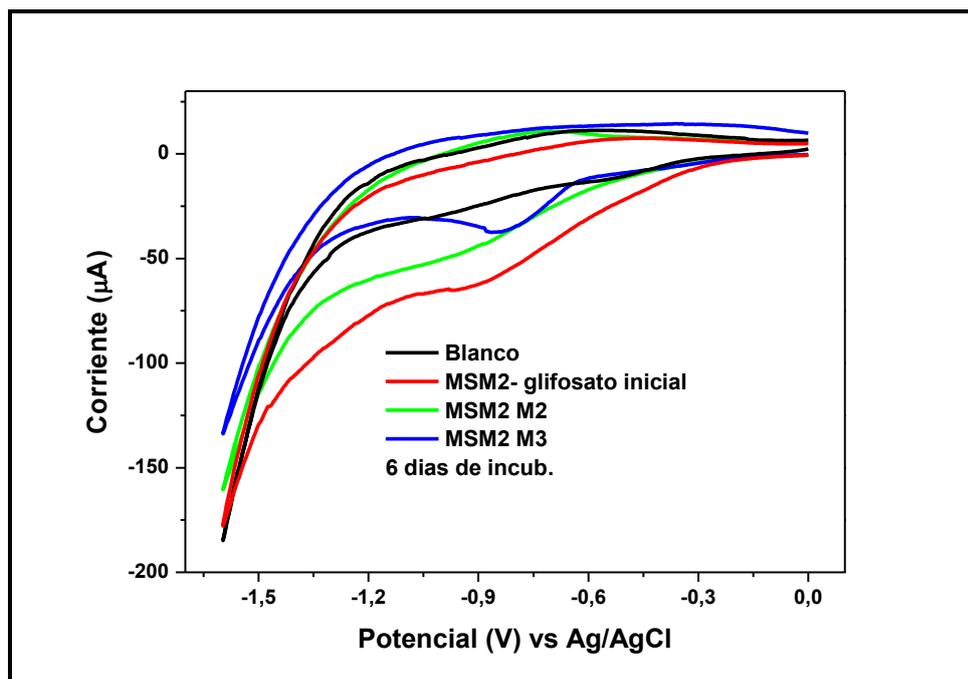


Gráfica 6 Voltamograma cíclico de la comparación de los medios MSM₁ y MSM₂ con el Glifosato comercial.

Al observar las gráficas 7 y 8 la disminución de la corriente en cada una de las muestras M2 y M3 en cada uno de los medios, se evidencia que las bacterias si lograron incorporarlo en su metabolismo y degradarlo.



Gráfica 7 Voltamograma cíclico de la comparación del medio MSM₁ con una concentración inicial de Glifosato, con las muestras M2 y M3 incubadas con este medio durante 6 días.



Gráfica 8 Voltamograma cíclico de la comparación del medio MSM₂ con una concentración inicial de Glifosato, con las muestras M2 y M3 incubadas con este medio durante 6 días.

4.3 Determinación del porcentaje de degradación

Al corroborar que el consorcio de bacterias aisladas si degradaban el Glifosato, se dio pasó a determinar el porcentaje de degradación en cada muestra pasados los 6 días de incubación. La ecuación 1 corresponde a la curva de calibración.

Ecuación: $Y = 427819,1X - 2,667$ (**Ecuación 1**)

Reemplazando: $X = \frac{20,7+2,667}{427819,1} = 5,45 \times 10^{-5} M \left(\frac{10}{1}\right) \left(\frac{10}{0,15}\right) = 0,0364 M$

$$0,0364 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times \frac{170 \text{g}}{1 \text{mol}} = 6,188 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

$$\% \text{Degradación} = \frac{\text{concentración inicial} - \text{concentración residual}}{\text{concentración inicial}} \times 100$$

$$\% \text{Degradación} = \frac{15 \frac{\text{g}}{\text{L}} - 6,188 \frac{\text{g}}{\text{L}}}{15 \frac{\text{g}}{\text{L}}} \times 100 = 58,75\%$$

Tabla 2 Tabla de resultados de concentración final y degradación de Glifosato.

	Muestra	Corriente	Concentración	%Degradación
Medio MSM₁	M₂	20,7μA	6,2g/L	59%
	M₃	17,5μA	5,3g/L	64%
Medio MSM₂	M₂	24,8μA	7,3g/L	51,5%
	M₃	14,5μA	4,6g/L	69,7%
			Promedio	61,1%

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se conoce que el carbono es uno de los mayores constituyentes celulares de las bacterias. Para ser obtenido, muchas de ellas lo consiguen por medio de mecanismos heterótrofos, utilizando así gran variedad de sustancias orgánicas, incluyendo compuestos xenobióticos como el Glifosato, es por eso que gracias a este metabolismo es viable pensar en posibles estrategias de bioremediación a partir de este tipo de bacterias (Ermakova, 2010). Estudios indican que el herbicida influye positivamente en el crecimiento bacteriano ya que puede suplir no solo las necesidades de carbono sino también de fósforo. Sin embargo, se hace referencia a pocas cepas con la habilidad de crecer en presencia de Glifosato como única fuente de carbono (Thomas, 2011). En suelos fumigados con el herbicida esta habilidad selectiva puede disminuir el crecimiento de algunas poblaciones microbianas que requieren otras fuentes de carbono o de fósforo como fuente de energía.

Como ya se mencionó, la degradación del Glifosato se produce mediante dos vías diferentes. En la primera, una liasa C-P rompe este enlace liberando fosfato inorgánico (Pi) y sarcosina, que posteriormente puede producir glicina. En la otra vía, la enzima Glifosato oxidoreductasa (GOX) cataliza la escisión de Glifosato en ácido aminometilfosfónico (AMPA) y glioxalato, es decir, que aquellas bacterias que degradan este compuesto mediante la primera vía mencionada lo utilizan como fuente de fósforo, lo que podría indicar que las bacterias aisladas con el medio selectivo MSM₂ siguen esta ruta metabólica y aquellas bacterias que lo hacen mediante la segunda vía lo utilizan como fuente de carbono, lo que explicaría el metabolismo de las bacterias aisladas con el medio selectivo MSM₁. También estudios demuestran que AMPA es el metabolito principal de este proceso de degradación y se reporta que a partir de esta molécula también es posible que las bacterias obtengan una fuente de fósforo (Thomas, 2011).

Durante el proceso de aislamiento bacteriano se evidenciaron diferentes características relacionadas con su crecimiento, las cuales son importantes de mencionar. Inicialmente para el medio selectivo MSM₁ se observó que en las primeras incubaciones las bacterias tardaban en formar UFC visibles, solo al cabo de 6 días era posible realizar los conteos. Luego al llegar a la tercera incubación (6g/L de Glifosato), las bacterias redujeron los días de crecimiento a 2 o 3 días. Con el medio MSM₂ además de que su crecimiento era mucho más abundante en comparación con MSM₁ (62%) (Gráficas 1 y 2) tardaban menos días en observarse UFC inicialmente entre 4 o 5 y luego entre 1 o 2 días. Pero al llegar a las incubaciones con mayor concentración de Glifosato (12 y 15g/L) el crecimiento comenzó a disminuir de igual manera para los dos medios.

Este tipo de comportamiento podría explicarse, por la cantidad de herbicida con el cual era fumigada el área donde fue tomada la muestra. Aspersiones cuidadosas cada 15 días en concentraciones muy bajas (2mL de Glifosato en 20L de agua). Se entendería que durante las primeras incubaciones se dio un

proceso adaptativo de las bacterias, donde murieron las más débiles o aquellas que no eran capaces de metabolizarlo. Al quedar las que conseguían hacerlo, fue posible para ellas seguir creciendo hasta llegar a concentraciones ya muy altas donde ya no era posible seguir metabolizándolo. Según el artículo "Isolation and characterization of glyphosate-degrading bacteria from different soils of Algeria" (Ouided, 2013) donde también realizaron el aislamiento de especies bacterianas a partir de un suelo contaminado con Glifosato, se le atribuye a que dicho comportamiento se debe a que inicialmente estos microorganismos requieren necesariamente de un período de aclimatación para inducir el camino degradativo necesario y además que las altas concentraciones de este organofosforado pueden llegar incluso a inhibir la acción de las enzimas catabólicas.

Por otro lado, los resultados del comportamiento del consorcio de bacterias aisladas con MSM₁ sugieren que un suelo pobre en carbono orgánico al ser fumigado con Glifosato de forma consecutiva, puede impactar drásticamente las poblaciones microbianas y en consecuencia desestabilizar sus funciones en el mantenimiento del equilibrio edáfico.

Dentro de la literatura consultada se reportan varias especies bacterianas a las cuales se les atribuye dicho metabolismo, entre las cuales se encuentran: *Ochrobactrum ciceri* (Khadivinia, 2014); *Enterobacter cloacae* K7 (Kryuchkova Y. V., 2013); *Achromobacter* sp. Kg 16 y *Ochrobactrum anthropi* GPK 3 (Ermakova, 2010); para bacterias degradadoras de Glifosato con fuente única de fósforo. Dentro del otro grupo de degradadoras con única fuente de carbono se reportan a *Stenotrophomonas maltophilia* y *Providencia alcalifaciens* (Choong, 2011). Otras fuentes bibliográficas identifican varias especies de pseudomonas como degradadoras de Glifosato entre ellas *P. maltophilia*, *P. putida*, *P. aeruginosa* y *Pseudomonas* ssp (Ouided, 2013).

Es importante aclarar que aunque en un principio este trabajo de investigación tenía como fin último ampliar el número de especies encontradas por parte de proyectos anteriores, durante el proceso de realización se encontró una metodología para lograr cuantificar el Glifosato degradado por las bacterias aisladas, conocido como voltametría cíclica. Por lo tanto y debido a que en anteriores proyectos no había sido posible este proceso, se decidió tomar un nuevo enfoque, encaminado a lograr encontrar las condiciones óptimas para llegar a estos resultados, como consecuencia de esto no fue posible identificar que especies bacterianas fueron aisladas sino, su capacidad y porcentaje de degradación.

En este mismo orden de ideas, a causa del amplio uso de herbicidas, como el Glifosato, el estudio de su cuantificación en suelos contaminados o para determinar la capacidad degradadora que tienen las bacterias, las cuales habitan en esta clase de superficies, ha conllevado al desarrollo de diferentes técnicas instrumentales para lograr efectuarlos. La mayoría de los métodos descritos en la literatura se basan en separaciones por técnicas cromatográficas.

Dentro de muchas de ellas podemos encontrar su identificación por medio de cromatografía de gases (CG) luego de un tratamiento previo de derivatización del Glifosato para convertirlo a derivado volátil y térmicamente estable. Los derivados de este compuesto han mostrado alta sensibilidad y selectividad en la determinación por medio de CG, cromatografía líquida, cromatografía iónica y electroforesis capilar pero los procedimientos de derivatización son bastante complicados y también generan productos inestables (González Curbelo, 2012).

Como se ha mencionado anteriormente la ausencia de grupos cromóforos o fluoróforos en la estructura de Glifosato, el método espectrofotométrico y fluorométrico directo para su determinación no es posible desarrollarse. Pero Jan Rasul y colaboradores presentan un método donde basados en la reacción del Glifosato con disulfuro de carbono convierten su grupo amino en ácido ditiocarbámico. Seguidamente el grupo formado es utilizado como grupo quelante para que reaccione con un ion metálico de transición como lo es el cobre [Cu (II)]. El resultado de estas reacciones es un complejo de color amarillo el cual es medido a una longitud de onda de 435 nm (Jan, 2009).

En vista de que los resultados con el uso de derivatizaciones no son tan apropiados, algunos autores reportan nuevas metodologías como el artículo "Residue Analysis of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) in Soybean Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry" donde a través de la cromatografía líquida de fase inversa acoplada a espectrometría de masas en tándem con electronebulización (LC-ESI / MS / MS) se realizó el proceso de cuantificación de Glifosato y AMPA en muestras de sojas en procedimientos de derivatización utilizando curvas de calibración preparadas a partir de una solución matriz del compuesto (Helio, 2011).

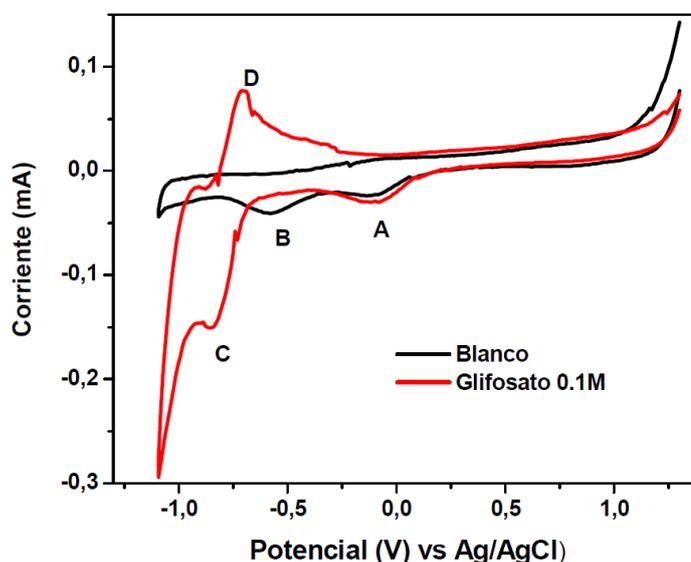
Esta metodología se intento implementar dentro de este proyecto en un equipo de cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple con electroespray marca Waters, pero no fue posible encontrar las condiciones optimas para una cuantificación confiable del Glifosato.

Por otro lado, podemos encontrar las técnicas electroquímicas mediante la cual también se ha involucrado el estudio de la identificación de este organofosforado. Esta metodología fue la desarrollada dentro de este trabajo de investigación, utilizando Voltametría Cíclica para lograr cuantificar la cantidad de Glifosato degradado por parte del consorcio de bacterias aisladas.

A partir de los resultados obtenidos se encuentra que la respuesta ciclo voltamétrica del complejo Pt^{2+} -Glifosato presenta un sistema redox que indica que adsorción del compuesto reducido sobre la superficie del electrodo.

En los voltamogramas mostrados en los resultados es posible observar la respuesta del complejo en medio de ácido perclórico pH 2,2. Al observar el voltamograma de la gráfica 9 se evidencia varias regiones características. Inicialmente encontramos el pico catódico A correspondiente al sobrepotencial de la reducción de H^+ adsorbido en la superficie del electrodo a H_2 ; el pico catódico B se asocia con la reducción de los contraiones que se adsorben en el electrodo de platino, el potencial puede cambiar dependiendo del electrolito utilizado, se conoce en la literatura que el fenómeno de adsorción de los contraiones del perclorato es débil, razón por la cual en presencia de glifosato este pico desaparece. El ácido perclórico permite formar una sal de amonio entre el GYP y el electrolito, generando en la superficie electródica un complejo adsorbido de platino amoniacal de glifosato, que es reducido a platino representado en el pico C. El pico D corresponde a la reducción del complejo-Pt (II) a Pt (Ilustraciones 8 y 9) (Balanta & Quiñonez, 2014).

Al analizar las gráficas presentadas en los resultados se observa que el único pico apreciable en los voltamogramas es el pico C, debido primeramente a que se utilizó glifosato comercial como referencia y no un estándar de Glifosato, la muestra comercial al igual que los medios MSM₁ y MSM₂ con Glifosato presentan en su contenido concentraciones de electrolitos adicionales que posiblemente no permitieron observar los otros picos A, B y D. Sin embargo, el pico C es característico del proceso y se evidencia claramente en todos los voltamogramas.



Gráfica 9 Voltamograma cíclico de glifosato en un electrodo de Pt (Balanta & Quiñonez, 2014)

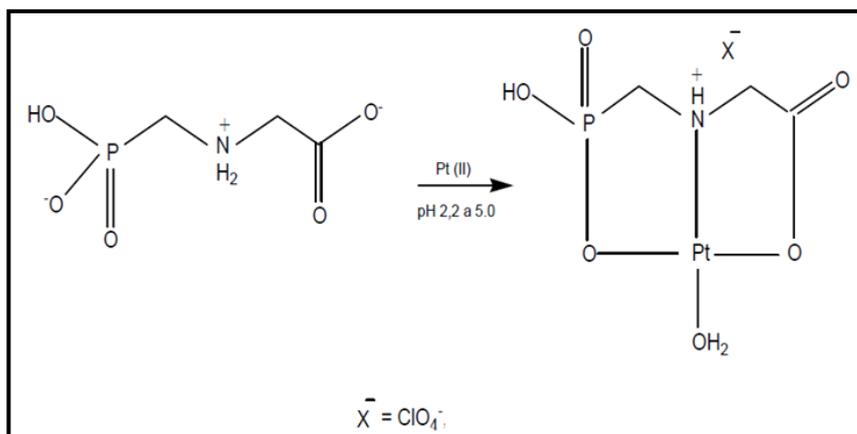


Ilustración 8 Formación del complejo Pt-Glifosato.

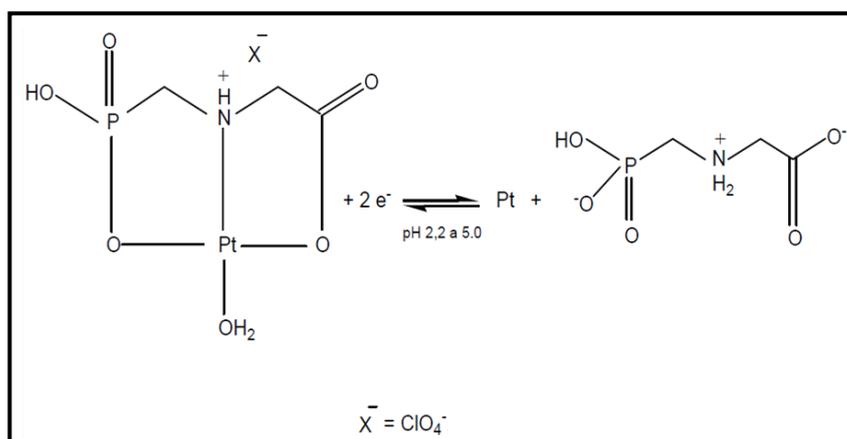


Ilustración 9 Reacción redox del complejo Pt-GYP.

Este mecanismo de reducción es semejante al encontrado en la literatura donde la oxidación de GYP reportada sobre un electrodo de cobre el acomplejamiento procede mediante la formación de una capa pasivante de Cu_2O en solución buffer a un pH superior a 6,5 la cual es oxidada a CuO y la película de óxido de cobre (II), así generada, es complejada por el GYP produciendo un incremento en la corriente de oxidación del cobre (Sierra, 2008).

Como se mencionó anteriormente el uso de un electrolito tiene un papel de gran importancia dentro de los análisis cuantitativos, ya que las reacciones electroquímicas se ven influenciadas por la naturaleza y la composición del solvente. Uno de los factores de mayor importancia para la elección de este sistema radica es su conductividad eléctrica ya que permitirá minimizar la corriente residual, además es el responsable de eliminar la corriente de migración, permitiendo que la especie electroattractiva llegue al electrodo por medio de difusión, carga y movilidad de los iones (Skoog, 2004). Según el trabajo de grado "Electroanálisis de Glifosato y Seguimiento de la Degradación con $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ " el ácido perclórico a un pH inferior a 3,00 permite el proceso de adsorción de este con el Glifosato, estabilizando el complejo formado.

El pH juega un papel importante en los resultados obtenidos, ya que el Glifosato presenta diferentes valores de pKa (Ilustración 10) los cuales se asocian a sus grupos funcionales: amino, fosfato y acetato. El pKa₁ de 2,0 corresponde a la pérdida de H⁺ del grupo fosfato, el pKa₂ de 2,2 corresponde a la pérdida de H⁺ del grupo acetato, el pKa₃ de 5,4 corresponde a la pérdida de H⁺ del grupo amino y finalmente el pKa₄ de 10,1 corresponde a la pérdida del H⁺ del grupo fosfato (Pintado, 2012).

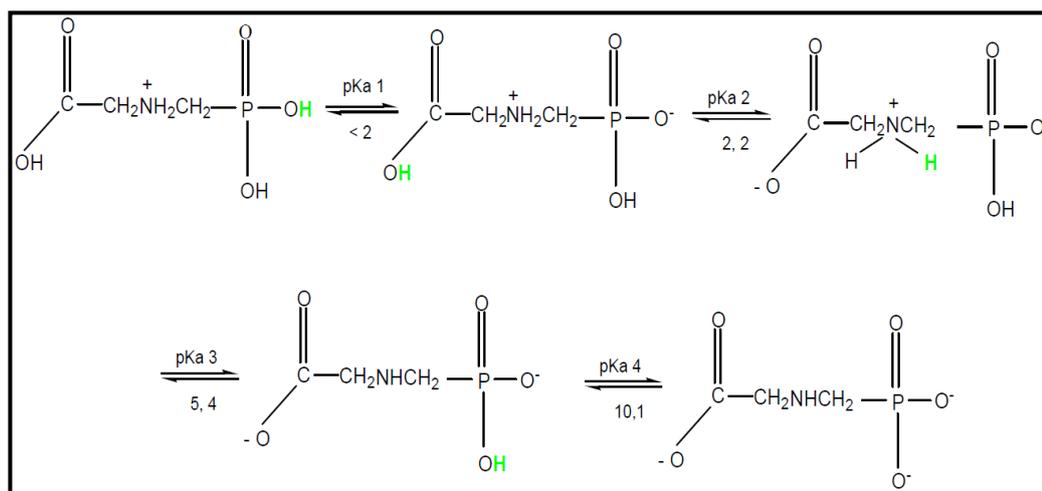


Ilustración 10 Valores del pKa del GYP.

Por lo anterior se puede decir que el glifosato involucra iones hidrógenos en el proceso electroquímico de tal manera que los potenciales redox dependerán del pH del medio. Un proceso electroquímico que consume o produce iones hidrógeno puede alterar el pH de la disolución en la superficie del electrodo, y estos cambios afectan el potencial de la reducción. Los grupos R-NH-R y el grupo R-COOH al estar en contacto con el electrolito pueden estar ionizado o protonados, actuando los dos como donantes o aceptadores de protones dependiendo del pH (Balanta & Quiñonez, 2014).

A partir del mecanismo presentado anteriormente, la protonación del grupo amino del glifosato es importante para poder establecer el complejo de iones platino. Según el trabajo de grado mencionado, dentro de su trabajo experimental se encontró que a pH superiores a 5,0 la reducción no se llevaba a cabo, pero a pH inferior a 4,0 la respuesta redox se veía intensificada, ya que en este rango de pH es cuando el glifosato tiene su grupo amino protonado. Al pasar de un pH de 4,0 a 3,0 se generó un incremento del 54% en la corriente lo que implicó un mejor desempeño analítico a pH inferior de 3,0. Por otro lado a valores por debajo de 2,0 la respuesta ciclo voltamétrica era poco definida comparada con el blanco. Es por eso que para el trabajo experimental de este proyecto se estableció un rango de pH entre 2,0 y 3,0.

En el presente escrito, se mencionó que la velocidad de formación del complejo está directamente relacionada con la concentración del analito, en este caso el Glifosato y así mismo esta característica es evidenciada con el aumento o

disminución de la corriente en los resultados. Si se observa en la gráfica 7 y 8 donde se realiza la comparación de la corriente entre la concentración inicial de glifosato en las muestras M2 y M3 con las bacterias aisladas con la concentración del mismo al cabo de siete días de incubación, se evidencia que la corriente disminuyó, lo cual se relaciona con la cantidad de Glifosato degradado por parte de las bacterias.

En tabla 2 se reporta el porcentaje de degradación encontrado para cada muestra. Para el medio MSM₁ la muestra M2 y M3 el porcentaje de degradación fue del 59% y 64% respectivamente. Y Para el medio MSM₂ la muestra M2 y M3 el porcentaje de degradación fue del 52% y 70%. Con un promedio total de remoción del 61,5%.

Finalmente, al haber analizado los resultados del crecimiento del consorcio de bacterias aisladas durante las diferentes concentraciones de Glifosato, y su capacidad degradadora, se espera encontrar dentro del grupo de bacterias aisladas con el medio MSM₁ con glifosato como única fuente de carbono, especies bacterianas no solo del grupo de aquellas que son capaces de degradar el Glifosato por esta vía (Metabolizandolo en AMPA y glioxalato), sino también, bacterias que lo metabolicen rompiendo el enlace C-P, ya que como se mencionó anteriormente se ha reportado que estas últimas logran hacerlo a partir del principal metabolito del Glifosato, el AMPA.

6. CONCLUSIONES

Se logró aislar un consorcio de bacterias las cuales presentan la capacidad de metabolizar Glifosato como fuente de carbono y como fuente de fósforo, a través de medios de cultivo selectivos. También se encontró que a pesar de que estos microorganismos poseen las enzimas necesarias para introducir este compuesto y metabolizarlo, a concentraciones altas del mismo las bacterias pueden morir, ya que las enzimas pueden ser inhibidas por el Glifosato a concentraciones elevadas.

Fue posible evidenciar la capacidad removedora de Glifosato por parte de las bacterias, mediante la cuantificación del organofosforado a través de la técnica Electroquímica: Voltametría Cíclica. Encontrando el porcentaje de degradación después de una incubación durante siete días.

Con la información encontrada durante el trabajo de investigación, se logró implementar nueva información para futuros proyectos encaminados a la implementación de potenciales estrategias de biorremediación para disminuir los impactos de este herbicida en el medio ambiente. Ya que primeramente, se estableció un método fácil para el aislamiento de consorcios bacterianos a partir de suelos contaminados. Y segundo por medio de una técnica electroquímica, es posible determinar el porcentaje de remoción de Glifosato por parte de las bacterias.

7. RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores se recomienda que a partir del consorcio de bacterias aisladas dentro este trabajo de investigación, realizar el aislamiento de colonias respectivo para lograr identificar que especies bacterianas se aislaron. Posteriormente continuar con la cuantificación del Glifosato degradado por estas, es decir, por especie aislada; a partir de la metodología implementada. Esto con el objetivo de analizar la cantidad degradadora específica por cada especie.

8. BIBLIOGRAFÍA

A.M. Botero-Coy, M. I. (2013). Direct liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean. *Journal of Chromatography A, Elsevier* , 157– 165.

Balanta, L. V., & Quiñonez, J. N. (2014). Electroanálisis de Glifosato y seguimiento de la Degradación con UV/H₂O₂. *Trabajo de grado para optar el título de Químico(a) Universidad Santiago de Cali, Facultad de Ciencias, Cali* , 16-38.

Bhatnagar, S. (2013). Bioremediation: A Sustainable Tool for Environmental Management. *Annual Review & Research in Biology* , 974-980.

Bisht, S. (2014). Inoculant technology in *Populus deltoides* rhizosphere for effective bioremediation of Polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soil, . *Plant Science* , 786-799.

Bott, S. e. (2011). Phytotoxicity of glyphosate soil residues re-mobilised by phosphate fertilisation. *Springer* , 249-256.

Buffin, D. (2001). Impactos sanitarios y ambientales del glifosato: Las implicaciones del aumento en la utilización de glifosato en asociación con cultivos genéticamente modificados. *Department of Medicine and Environmental Health* .

Buzzo de Brum, M. A. (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. Montevideo.

Campos, F. e. (2012). Response of Eucalyptus (*Eucalyptus urograndis*) Plants at Different Doses of Glyphosate. *Journal of Agricultural Science* , 66-72.

Chavarrías, M. (2009). El Futuro de los Transgénicos. *Ediporc* , 26-30.

Choong, T. (2011). Glyphosate Utilization as the Source of Carbon: Isolation and Identification of new Bacteria. *E-Journal Of Chemistry* , 1582-1587.

Company, T. D. (2014). *Dow AgroSciences*. Recuperado el 14 de 12 de 2014, de <http://www.dowagro.com/ar/semillas/herculexl.htm>

Dinham, B. (2009). *Glifosidio*. Recuperado el Noviembre de 2013, de <http://www.glifocidio.org/docs/impactos%20generales/ig1.pdf>

Ermakova, I. T. (2010). Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. *Environmental Biotechnology* , 587-594.

Ghosh, T. C. (2010). Bioremediation of Xenobiotics-contaminated Sites:

Concept and Selected Case Studies. En m. h. Fulekar, *Bioremediation Technology* (págs. 10- 16). Springer.

Glyphosate Use in Forest Plantations, 2010 *Chilean Journal of Agricultural Research* 654-657

González Curbelo, M. Á. (2012). Sample-preparation methods for pesticide-residue analysis in cereals and derivatives. *Trends in Analytical Chemistry* , 32-40.

Harris, D. C. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. España: Reverte.

Helio, M. (2011). Residue Analysis of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) in Soybean Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Intechopen, Biochemistry, Chemistry and Physiology* , 495-504.

Herbicida Glifosato: Usos, Toxicidad Y Regulación, 2011 *Biorevista Técnica* 23-27

Hernández, F. (2010). Análisis de Residuos de Plaguicidas Polares, con especial énfasis en el Herbicida Glifosato: Problemática Analítica. *Aspectos Ambientales del Usos de Glifosato* , 9-13.

Jan, R. (2009). Glyphosate herbicide residue determination in samples of environmental importance using spectrophotometric method. *Journal of Hazardous Materials, Elsevier* , 742-745.

Juwarkar, A. A. (2012). Biosurfactants: Potential Biomolecules for Bioremediation of Metals. *Noca Science Publishers, Inc* , 207-2018.

Khadivinia, E. (2014). Cadmium biosorption by a glyphosate-degrading bacterium, a novel biosorbent isolated from pesticide-contaminated agricultural soils. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* , 4304-4309.

Kogan, M. (2010). Glyphosate use in Forest Plantations. *Chilean Journal of Agricultural Research* .

Kogan, M. (2010). Glyphosate Use in Forest Plantations. *Chilean Journal of Agricultural Research* , 654-657.

Kryuchkova, Y. V. (2013). Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. *Microbiological Research* , 99-105.

L. Lorentz, R. B. (2011). Recovery of plants and histological observations on advanced weed stages after glyphosate treatment. *Weed Research* , 333-342.

Lemus Grijalva, J. M. (2007). Evaluación de la maduración artificial de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.) en suelos húmedos con dos herbicidas a base de

glifosato. Tesis. Zamorano. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria , 2-6.

Londoño Zapata, N. (2006). Lo Ambiental y lo Social de la Asperción el Colombia ¿Política Ambiental o Estrategía Antinarcóticos? *Desafíos* , 197-201.

Marcelo, K. (2010). Glyphosate use in Forest Plantations. *Chilean Journal of Agricultural Research* , 653-657.

Martins, H. A. (2011). Residue Analysis of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) in Soybean Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology* , 497-504.

Merchán, F. A. (2010). Fumigaciones de cultivos ilícitos con glifosato: ¿Solución o catástrofe? *Revista Económica Supuestos* .

Mosanto. (2002). Evaluación de la Seguridad del Maíz Roundup Ready. *Monsanto Agricultura España, S.L.* , 5-21.

Muhammad, M. (2009). Glyphosate herbicide residue determination in samples of environmental importance using spectrophotometric method. *Journal of Hazardous Materials, Elsevier* , 742-745.

Nivia, E. (2009). *Foro V IFCS Sesión plenaria de información y deliberación sobre enfoques y herramientas para la aplicación de criterios de precaución en el contexto de la seguridad química* . Colombia: Organización Mundial de la Salud .

Oirtiz, S. (2005). *Apuntes Científicos Uniandes*. Recuperado el Noviembre de 2013, de <http://hipotesis.uniandes.edu.co/hipotesis/images/stories/ed06pdf/Glifosato.pdf>

Ortega Ramírez, R. (2009). Maíz transgénico: riesgos y beneficios. *Revista Universidad de Sonora* , 41-43.

Ouided, B. (2013). Isolation and characterization of glyphosate-degrading bacteria from different soils of Algeria. *African Journal of Microbiology Research* , 5587-5595.

Pavón, M. M. (2005). Comportamiento electroquímico del cobre en disoluciones acuosas de iones perclorato, cloruro y fosfato, y en presencia de inhibidores de su corrosión. *Tesis de doctorado* , 20-98.

Pintado, S. (2012). Electrochemical Determination of Glyphosate in Waters Using Electrogenerated Coppe Ions. *Int J Electrochem* , 2523-2530.

Quintana, M. P. (1998). Aislamiento y caracterización de cepas de Bacillus spp. Productoras de enzimas proteolíticas para la producción de hidrolizados de proteínas. *Revista Avanzada Científica* .

- Rasul, J. e. (2009). Glyphosate herbicide residue determination in samples of environmental importance using spectrophotometric method. *Journal of Hazardous Materials, El Sevier* , 742-745.
- Samsel, A. (2013). Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases. *entropy* , 1416-1463.
- Sasal, M. C. (2010). "Pérdidas de Glifosato por Drenaje y Escurrimiento en Molisoles bajo Siembra Directa". *Información Tecnológica Vol. - 21 N° 5 -* .
- Sierra, E. V. (2008). Electrooxidación de Glifosato sobre Electroodos de Níquel y Cobre. *Quim Nova* , 220-226.
- Silva, M. E. (2001). Optimización de la Biosíntesis de Zeaxantina por *Flavobacterium* sp. *Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*.
- Sirinathsinghji, E. (2012). Glyphosate Hazards to Crops, Soils, Animals, and Consumers. *Institute of Science in Society* .
- Skoog, D. (2004). *Fundamentos de Química Análítica*. Mexico: Cengage Learning.
- Thomas, C. (2011). Glyphosate Utilization as the Source of Carbon: Isolation and Identification of new Bacteria. *E-Journal of Chemistry* , 1583-1587.
- Wagner, R. (2003). Phytotoxic activity of root absorbed glyphosate in corn seedlings . *Weed Biology and Management* , 228–232.
- Wang, X. (2012). Bioremediation of the tobacco waste-contaminated soil by *Pseudomonas* sp. HF-1: nicotine degradation and microbial community analysis. *Environmental Biotechnology* , 6077–6088.
- Zobiole, L. H. (2010). Amino Acid Application can be an Alternative to Prevent Glyphosate Injury in Glyphosate-Resistant Soybeans. *Journal Of Plant Nutrition* , 268-270.

ANEXOS

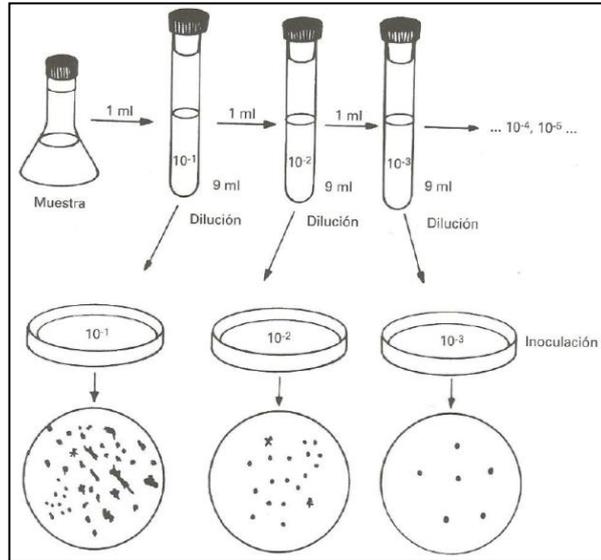


Ilustración 11 Esquema del procedimiento de diluciones en serie para las muestras microbiológicas líquidas y sólidas.



Ilustración 12 Muestra de un suelo 1



Ilustración 13 Muestra de un suelo 2



Ilustración 14Muestra de un suelo 3



Ilustración 15Muestras de los tres suelos



Ilustración 16Secado de la muestra de suelo

Tabla 3 Propiedades Físicoquímicas del Glifosato.

Propiedad	Compuesto Puro (Ingrediente activo)	Sal de Glifosato-Isopropilamonio
Fórmula Molecular	C ₃ H ₈ N O ₅ P	C ₆ H ₁₇ N ₂ O ₅ P
Peso Molecular	169.1 g/mol	228.2 g/mol
Estado Físico	Sólido blanco	Líquido viscoso de color ámbar a amarillo
Olor	Inodoro	Prácticamente inodoro, ligero olor a amina
Densidad	0.5 g/ml	1,160 - 1,180 g/mL
Punto de Fusión	184,5 °C	No Aplicable (Estado líquido)
Presión de Vapor	1,84 x 10 ⁻⁷ mm de Hg a 45°C	3 x 10 ⁻⁷ mm Hg a 25°C
Punto de Ebullición	Se descompone	Se descompone
pH en solución al 1%	2,5	4,7
Solubilidad en Agua	12.000 ppm a 25°C	900.000 ppm a 25°C
Otros Solventes	Ninguno	Sólo soluble en agua
Estabilidad	32 días a 25°C y pH = 5,7 ó 9	32 días a 25°C y pH = 7 ó 9
Coefficiente de Partición octanol/agua	P _{ow} = -2,8	N.D.
Constante de Ley de Henry	< 7 x 10 ⁻¹¹	N.D.
Corrosividad	No corrosivo	No Corrosivo
Punto de inflamación		
Productos de combustión		
Reactividad con materiales del envase		

Tabla 4 Composición del medio de cultivo selectivoMSM₁.

Reactivos	Medio Enriquecido
KH ₂ PO ₄	1,5 g/L
Na ₂ HPO ₄	0.6g/L
NaCl	0.5g/L
NH ₄ SO ₄	2 g/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g/L
CaCl ₂	0.01g/l
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0.001g/L

Tabla 5 Composición del medio de cultivo selectivoMSM₂.

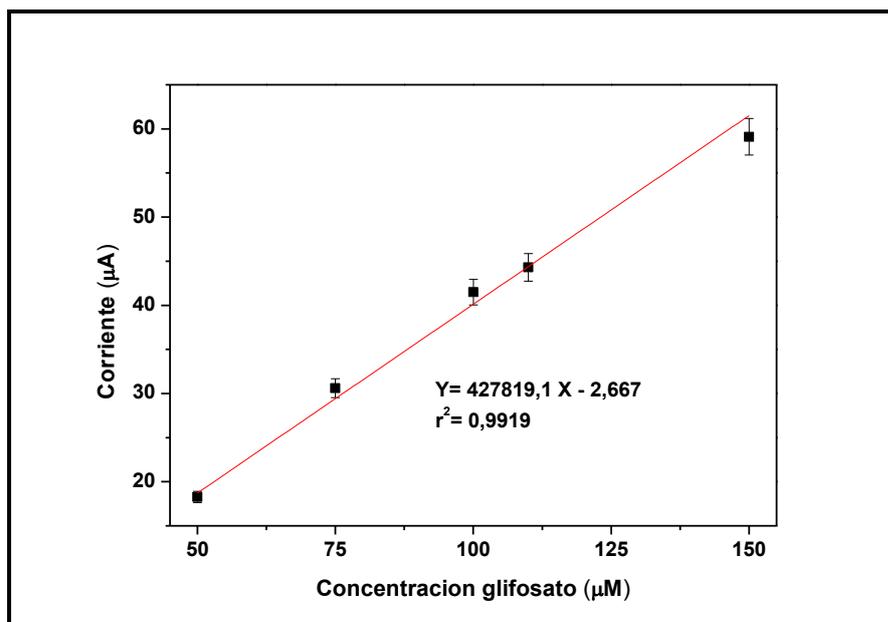
Reactivos	Medio Enriquecido
Tris Buffer	12g/L
NaCl	0.5g/L
NH ₄ SO ₄	2 g/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g/L
CaCl ₂	0.01g/l
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0.001g/L
Glucosa	12g/L

Tabla 6 Composición del medio de cultivo enriquecido.

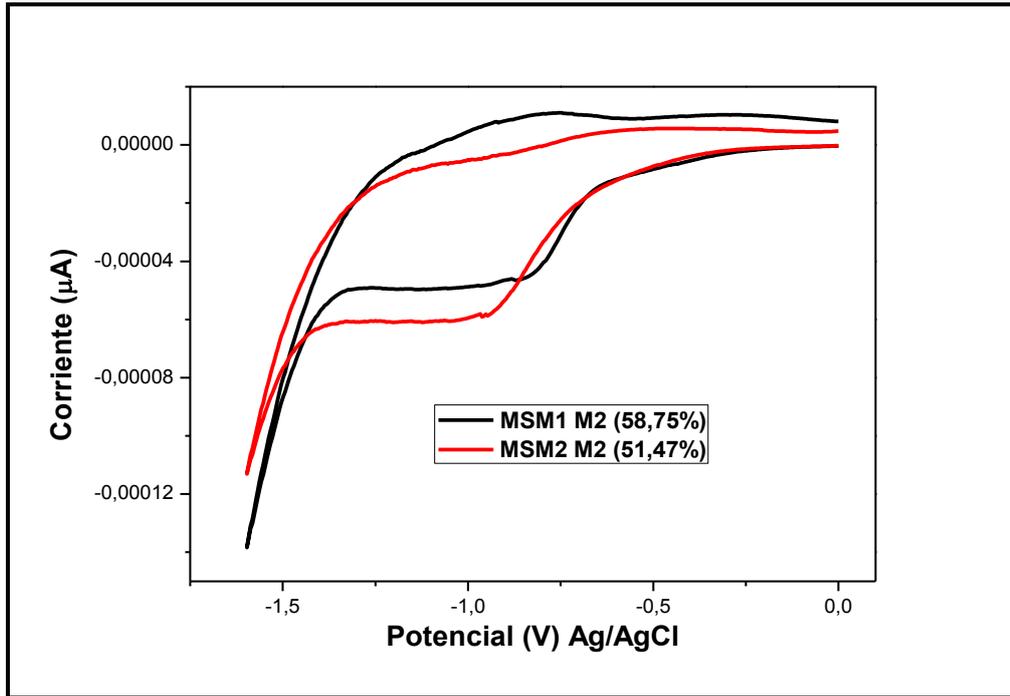
Reactivos	Medio Enriquecido
KH ₂ PO ₄	1,36 g/L

NH₄SO₄	0.5 g/L
MgSO₄ x 7H₂O	0,20 g/L
CaCl x 2H₂O	0.01g/L
FeSO₄ x 7H₂O	5.00mg/L
MnSO₄ x 7H₂O	2.50 mg/L
Na₂MoO₄ x 2H₂O	2.50 mg/L
Na₂HPO₄	2.13mg/L
Glucosa	10.00g/L

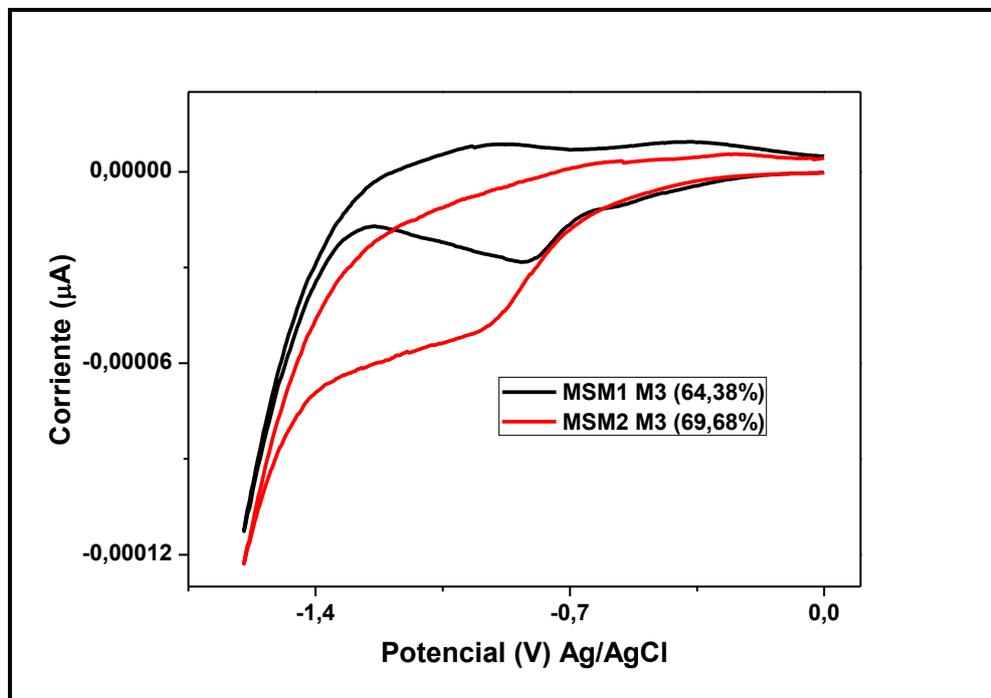
Equation	y = a +		
Adj. R-Sq	0,9919		
		Value	Standard
B	Interce	-2,66696	1,47107
B	Slope	427819,1	19204,5



Gráfica 10 Curva de Calibración para la cuantificación del Glifosato



Gráfica 11 Voltamperograma cíclico de la comparación del porcentaje de degradación de Glifosato en la muestra M2 durante 6 días en los dos tipos de medios (MSM₁ y MSM₂).



Gráfica 12 Voltamperograma cíclico de la comparación del porcentaje de degradación de Glifosato en las muestra M3 durante 6 días en los dos tipos de medios (MSM₁ y MSM₂).