

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CAPACES DE
DEGRADAR GLIFOSATO**

ANDRÉS FELIPE MÉNDEZ VILLAQUIRAN

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO CIENCIAS QUÍMICA
PROGRAMA QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2015**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CAPACES DE
DEGRADAR GLIFOSATO.**

ANDRÉS FELIPE MÉNDEZ VILLAQUIRAN

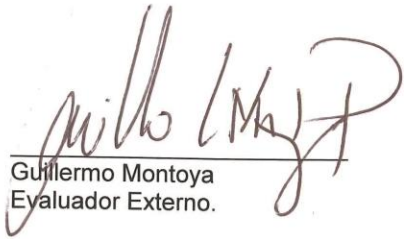
**Trabajo de grado para optar al título de pregrado en QUÍMICO
FARMACÉUTICO**

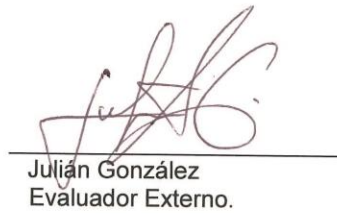
**Tutor del proyecto de Investigación:
Dr. Aram Joel Panay Escobar**

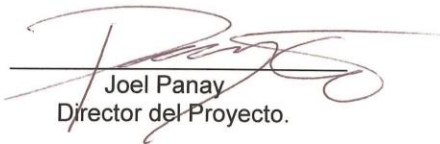
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO CIENCIAS QUÍMICA
PROGRAMA QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2015**



APROBADO POR:


Guillermo Montoya
Evaluador Externo.


Julián González
Evaluador Externo.


Joel Panay
Director del Proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo de investigación, quiero agradecer primeramente a Dios padre por haberme permitido tener fuerzas, alegría y brindarme la capacidad física e intelectual para desarrollar este proyecto académico.

A mi familia por apoyarme económicamente y espiritualmente en cada meta que me propongo.

A mi director de proyecto el doctor Aram Joel Panay, por brindarme su conocimiento, tolerancia y apoyo, y a los investigadores Catalina Mosquera y Cristhian Yarce porque su ayuda incondicional fue de gran importancia para culminar con éxito este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN DEL PROYECTO.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	12
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	15
2.3 OBJETIVOS.....	24
Generales.....	24
Específicos.....	24
2.4 METODOLOGÍA.....	25
Aislamiento y selección.....	25
Determinación del crecimiento bacteriano.....	25
Efecto del glifosato sobre las comunidades microbianas en tierra fértil.....	26
Cuantificación de degradación de glifosato.....	26
2.5 RESULTADOS.....	29
Evaluación de la tolerancia al glifosato.....	29
Evaluación del crecimiento bacteriano en tierra fértil expuesto a diferentes cantidades de glifosato en los días 1, 10 y 30.....	30
Monitorización del derivatizante ACQ mediante cromatografía en capa fina.....	32
Cuantificación de la degradación de glifosato.....	32
2.6 DISCUSIÓN	36
2.7 CONCLUSIONES.....	41
2.8 RECOMENDACIONES.....	42
3.11 BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXOS.....	44

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Comportamiento de los cultivos de coca y amapola desde 2000 al 2004, hectáreas y cantidad de Round-UP ®Ultra, utilizado.....	12
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del glifosato y sal de glifosato isopropilamonio.....	16
Tabla 3 Sales del medio selectivo sólido donde el glifosato es utilizado como fuente de Carbono (M1C).....	26
Tabla 4 Sales del medio selectivo sólido donde el glifosato es utilizado como fuente de Fosforo (M2F).....	27
Tabla 5. Condiciones cromatográficas del HPLC UV.....	28
Tabla 6 Resultados cromatográficos arrojados por el Hplc-UV para las muestras (M1C) y (M2F) en los días uno, tres y siete.....	34
Tabla 7. Resultados de la Cuantificación de la degradación de glifosato.....	35

LISTA DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1. Evaluación del crecimiento bacteriano a dos concentraciones de glifosato donde se utilizó como única fuente de carbono (M1C).....	29
Gráfica 2. Evaluación del crecimiento bacteriano a dos concentraciones de glifosato donde se utilizó como única fuente de fosforo (M2F).	29
Gráfica 3. Comparación del crecimiento bacteriano a una concentración de glifosato en porcentaje.....	30
Gráfica 4. Evaluación del crecimiento bacteriano a tres cantidades de glifosato y un blanco para el día uno.....	30
Gráfica 5. Evaluación del crecimiento bacteriano a tres cantidades de glifosato y un blanco para el día veinte.....	31
Gráfica 6. Evaluación del crecimiento bacteriano a tres cantidades de glifosato y un blanco para el día treinta.....	31
Gráfica 7. Variación de la concentración (60ppm) de glifosato en la muestra en un periodo de tres días; día uno, día tres y siete para la muestra (M1C).....	33
Gráfica 8. Variación de la concentración (60ppm) de glifosato en la muestra en un periodo de tres días; día uno, día tres y siete para la muestra (M2F).....	33

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Porcentaje de incremento en el azúcar recuperable de cuatro variedades de caña de azúcar que recibieron la aplicación de diferentes dosis de Roundup®	13
Figura 2. Estructura química del glifosato.....	16
Figura 3. Efecto del glifosato en la ruta del ácido Shikimico en la plantas.....	17
Figura 4. Degradación del glifosato en el suelo.....	20
Figura 5. Reacción de derivatización del ACQ.....	22
Figura 6. Hidrolisis del exceso de AQC.....	23
Figura 7. Cromatografía en capa fina del derivatizante, glifosato más derivatizante y leucina más derivatizante.....	32

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1 .Curva de calibración con 4 concentraciones de glifosato, para determinar la degradación biológica de 60 ppm del herbicida.	47
Anexo 2. Cromatogramas de la curva de calibración (20 ppm, 40 ppm, 80 ppm y 100 ppm).....	47
Anexo 3. Espectro del UV del glifosato derivatizado con el ACQ.....	48

RESUMEN

Los microorganismos desempeñan un papel importante en el tratamiento de agentes contaminantes en el medio ambiente como el glifosato, por ello es esencial el estudio y conocimiento científico de estos para mejorar las condiciones ambientales de los diferentes ecosistemas. En este trabajo, se aislaron diferentes consorcios de bacterias de dos muestras criopreservadas, en la cual habían algunas con potencialidad degradadora de glifosato, una llamada (M1C) donde el herbicida es utilizado como fuente de carbono y la otra (M2F) fue utilizada como fuente de fósforo a una concentración de 6 g/L de glifosato, para luego determinar su capacidad degradadora. También en este estudio, se logró determinar el efecto del glifosato a diferentes cantidades (10 mg, 100 mg y 1000 mg) sobre las comunidades microbianas en una muestra de tierra fértil, en el cual se encontró que este agente químico, tiene efectos en el crecimiento de las bacterias. Por otro lado, la capacidad degradadora se evaluó a escala de laboratorio durante siete días, empleando la técnica de Hplc acoplado a UV; el tratamiento (M1C) removió aproximadamente un 54.50% mientras que para el tratamiento (M2F) removió aproximadamente un 66.05%.

Palabras claves: bacterias degradadoras de glifosato, glifosato, comunidades bacterianas en tierra fértil y biorremediación.

ABSTRACT

Microorganisms play an important role in the treatment of pollutants in the environment such as glyphosate. Thus, the study and scientific knowledge of these are essential for improving the living conditions of the different ecosystems. In this work, different consortia of bacteria, from two cryopreserved samples, were isolated in which there were bacteria with potential degrading glyphosate. One called (M1C), where the herbicide is used as a carbon source and the other one called (M2F) that was used as a source of phosphorus, at a concentration of the selective means of 6 g/L of glyphosate and then it would be able to determine their degrading capacity. Furthermore, in this study, it was possible to determine the effect of glyphosate, in different amounts (10 mg, 100 mg and 1000 mg), on bacterial communities in a sample of fertile soil, in which it was found that this chemical has significant effects on the growth of bacteria. On the other hand, the degrading capacity was evaluated on a laboratory scale for seven days, using HPLC technique coupled with UV. Treatment (M1C) removed approximately 54.50 % while treatment (M2F) removed approximately 66.05 %.

Keywords: glyphosate degrading bacteria, glyphosate, bacterial communities in fertile soil and bioremediation.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el uso de herbicidas para el control en el crecimiento de las plantas ha venido creciendo de manera rápida debido a su bajo costo y la eficiencia a la hora de controlar la "maleza"; el más utilizado es el Glifosato, compuesto organofosforado utilizado como herbicida no selectivo de amplio espectro (Bravo, 2004). En el panorama nacional, este herbicida ha sido usado para en el control de los cultivos ilícitos, grandes plantaciones como la caña de azúcar, papa y maíz. Debido a esto han surgido constantes críticas por la forma en que se aplica, principalmente la aspersión aérea ya que se ha comprobado que no solo afecta su centro diana si no también los ecosistemas subyacentes a estos. (Garzón, 2009)

Dada la alta contaminación que enfrenta el planeta tierra, se ha estado innovando en nuevas formas de descontaminar las zonas afectadas por estos agentes químicos, una de estas es la biorremediación, la cual se emplea para eliminar contaminantes ambientales. Esta técnica usa microorganismos, hongos y plantas que tienen la capacidad de degradar compuestos químicos y transfórmalos en otros de menor toxicidad para el ambiente. Cabe resaltar que los microorganismos como bacterias, hongos entre otros, debido a su evolución natural se han adaptado a estos nuevos compuestos químicos utilizándolos como fuente de energía ya que estos contienen en sus moléculas compuestos que pueden ser utilizados como fuente de carbono, fósforo entre otros. Por ello se recurre a la toma de muestras donde ya se ha utilizado este herbicida porque aumenta la posibilidad de encontrar bacterias con potencialidad de degradar el glifosato.

Frente a esta problemática, se procedió el aislamiento de bacterias con alta potencialidad degradadora de glifosato, así como el efecto que tiene este herbicida sobre las comunidades bacterianas que se encuentran en la tierra fértil. Para ello se utilizaron medios de cultivos enriquecidos y selectivos que proporcionaron a las bacterias una fuente de carbono y fósforo; finalmente para poder evaluar la capacidad degradadora del glifosato se hizo necesario el empleo de la técnica de HPLC acoplado a UV mediante una derivatización precolumna. Los resultados obtenidos permitirán a futuro utilizar las cepas bacterianas para la biodegradación del glifosato.

2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PERTINENCIA DEL PROYECTO

Una de las grandes necesidades de investigación en el mundo está relacionada directamente en el ámbito medio ambiental y los recursos auto-sostenibles para mejorar la calidad de vida de los seres vivos. Por ello ha surgido la biorremediación como una de las alternativas más viable para descontaminar suelos y aguas.

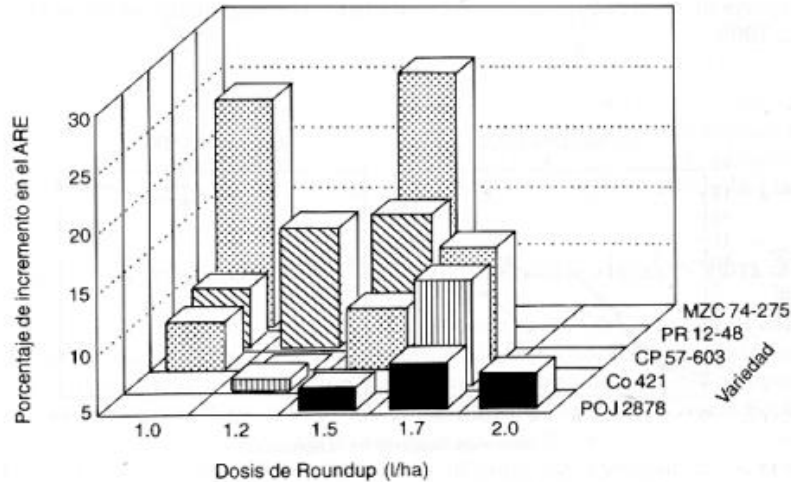
En Colombia desde que inicio “el plan Colombia” hace aproximadamente 15 años, se ha venido utilizando el glifosato como la principal herramienta para el control de los cultivos ilícitos, en su mayoría los sembrados de coca y amapola. La antigua dirección nacional de estupefacientes (DNE) dice que la presentación comercial de *Round-UP® Ultra*, constituye en proporción el 44% V/V lo que determina una concentración de 180 g de la sal Isopropilamina del glifosato como principio activo por litro de la mezcla. Además se agrega el surfactante no ionico cosmoflux® 411F y agua 1:55 V/V respectivamente. Inicialmente *Round-UP® Ultra*, fue asperjado bajo una tasa de 8L/ha, luego para el 2002 el DNE aprobó un incremento del herbicida hasta 10.4 L/ha sobre cultivos de coca y amapola. Esto excede las concentraciones recomendadas por el fabricante de 1.6% a 7.7% y una tasa de aspersión de un galón por acre (2.33 L/ha) (Santander, 2011).

Tabla 1. Comportamiento de los cultivos de coca y amapola desde 2000 al 2004, hectáreas y cantidad de *Round-UP® Ultra*, utilizado. (Santander, 2011)

Año	Hectáreas de coca cultivadas	Hectáreas de coca asperjadas	Hectáreas de amapola cultivadas	Hectáreas de amapola asperjadas	Cantidad de <i>Round-up® Ultra</i> utilizado, L
2000	162.510	58.073	6.500	9.254	603.970
2001	144.807	94.153	6.200	2.066	984.848
2002	102.071	130.364	4.153	3.371	1.061.538
2003	86.340	132.817	4.026	2.995	1.381.296
2004	80.350	136.552	3.950	3.061	1.420.130

Un panorama parecido se observa en los cultivos de caña de azúcar y maíz transgénico en Colombia, según CeniCaña Actualmente se aplican entre 0.75 y 1.5 L/ha del producto comercial y volúmenes de mezcla entre 5 y 20 L/ha. Para el maíz transgénico el utilizado es: Rimaxato® y Roundup® 35.6 L/ha y (Hernández, 2011). Cabe resaltar que este tipo de industria agrícola tienen en cuenta la dosis del producto y los volúmenes de la mezcla que se determinan con base en las condiciones siguientes: (1) estado de desarrollo del cultivo, (2) estado de volcamiento del cultivo, (3) tipo de suelo, (4) equipo de aplicación. (Arcila, 2000)

Figura 1. Porcentaje de incremento en el azúcar recuperable de cuatro variedades de caña de azúcar que recibieron la aplicación de diferentes dosis de Roundup®. (Luz Edith Barba-Ho, 2011)



En un informe oficial del Consejo Nacional de Estupefacientes (CNE), encargado del programa de erradicación se menciona que se aprobó la suspensión de las fumigaciones por aspersión aérea debido a que la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su último informe clasificó al herbicida como un potencial cancerígeno. Como se mencionó anteriormente en Colombia el producto Roundup es el más utilizado, como herbicida en cultivos de caña de azúcar y para el control de malezas en las plantaciones de árboles frutales, plátano, banano y palma africana. De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), el glifosato no se considera un agente cancerígeno y por ello se encuentra clasificado en el grupo D debido a que han realizado diferentes estudios en bacterias in vitro el cual lleva a la conclusión de que no existen eventos genotóxicos.

Con el fin de encontrar alternativas de biorremediación para el control ambiental del glifosato, el proyecto tiene el propósito de identificar y aislar bacterias que incorporen en sus rutas metabólicas y degraden este herbicida, lo cual permitirá ampliar el abanico de bacterias identificadas en el grupo de investigación en biocatalizadores de la Universidad Icesi capaces de degradar glifosato y las cuales serán la base de herramientas para la biorremediación.

Hasta el día de hoy se han estudiado un gran número de bacterias con potencialidad degradadora de glifosato y con ello su aislamiento e identificación para ser utilizadas como mecanismo de biodegradación de suelos y aguas contaminados con este herbicida. Entre estas se destacan las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Burkholderia gladioli* y *Flavimonasory zihabitans*, entre otras (Patricia Martínez- Nieto, 2012). Gracias a que poseen la característica de utilizar el glifosato como fuente de carbono o fósforo en su

metabolismo, por lo cual son útiles para la degradación y descontaminación de las áreas afectadas.

Ante esta situación y bajo el contexto del proyecto se busca dar respuesta a la siguiente pregunta: ¿existirán comunidades bacterianas que tengan la capacidad de utilizar el glifosato como fuente de fósforo y carbono y a su vez determinar el efecto que tiene el herbicida en la tierra fértil?

2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

El uso de herbicidas en los cultivos agrícolas del Valle del Cauca ha venido en constante aumento, y por lo tanto, se han generado cuestionamientos sobre su uso indiscriminado, ya que genera un impacto ambiental (Decreto, 2009). Según el CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS de Buenos Aires, Argentina, dependiendo del tiempo de exposición, la cantidad y concentración en el que se esté utilizando el glifosato se pueden generar daños, por ejemplo los trabajadores expuestos al glifosato formulado han desarrollado con frecuencia efectos irritativos a nivel de piel y mucosa (Decreto, 2009). Debido a que gran parte de la zona geográfica del valle del río Cauca se utiliza para el cultivo de caña de azúcar, es importante buscar soluciones para disminuir la contaminación de los suelos y aguas con estos compuestos (Luz Edith Barba-Ho, 2011). En Colombia el herbicida más utilizado es el glifosato, tanto para cultivos ilícitos (planta de coca y amapola), como para grandes plantaciones de papa, maíz, arroz y caña de azúcar. Por su gran versatilidad es adecuado para el control de muchas especies de malezas, en tratamientos de post emergencia al follaje, no actúa sobre las semillas en el suelo y tampoco es absorbido por las raíces (García Jaramillo, 2012).

En el mundo agropecuario, las malezas son la principal limitante en la producción comercial de cultivos agrícolas, reduciendo drásticamente la productividad de los estos, ya que, atrae plagas y disminuye el crecimiento de las plantaciones por competencia de recursos para su nutrición. Debido a que la utilización de herbicidas es hasta ahora el proceso más rápido y económico para el control de estos problemas, es de vital importancia que como recurso inherente a su utilización, los productores de estos cultivos conozcan estos productos en su composición natural o sintética, su uso, su modo de acción, su manejo y su toxicidad (Luz Edith Barba-Ho, 2011); para así mantener bajo control los posibles efectos adversos en el ecosistema donde se encuentre. Cabe aclarar que en los cultivos de caña de azúcar el glifosato (Roundup, marca comercial) es utilizado también como madurante (compuesto orgánico que en pequeñas cantidades inhibe, fomenta o modifica de alguna forma, procesos fisiológicos de la planta.) y herbicida, ya que, reduce la actividad de la enzima ácido invertasa involucrada en el metabolismo del azúcar, por lo cual ha traído beneficios a los ingenios azucareros en el ámbito productivo y económico. (García Jaramillo, 2012).

En la caña de azúcar, el madurante actúa como un regulador de crecimiento que permite una mayor concentración de sacarosa. Como se menciona anteriormente, la enzima ácido invertasa es la más afectada por acción del glifosato, ya que, parece reducir los niveles de esta en las cañas tratadas, y por consiguiente, también disminuye los niveles de glucosa y fructosa. Como resultado de lo

anterior, menos sacarosa se desdobra para su crecimiento y se almacena en las células, principalmente en las del tercio superior del tallo (Saenz Soto, 2009)

El N-fosfonometil glicina (figura 2), es una solución líquida, clara, viscosa y de color ambarino, con un grado de toxicidad nivel II según la U.S EPA. La solubilidad en agua es alta (molécula hidrófila), su coeficiente de partición octanol/agua, es de - 2.8 a una temperatura de 25°C. Cuando se encuentra en solución, presenta características iónicas, no se volatiliza del agua ni del suelo y su gravedad específica es de 1,17. Prácticamente es inoloro o con un ligero olor a amina; tiene un peso molecular de 169,08 g/mol y un punto de fusión de 184.5 °C. (Gary M. Williams, 2000).

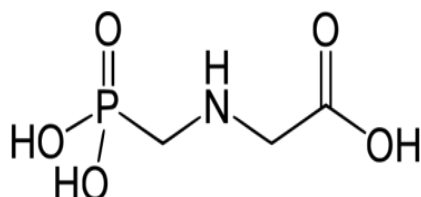


Figura 2. Estructura química del glifosato.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del glifosato y sal de glifosatoisopropilamonio. (Bravo, 2004)

Propiedad	Compuesto Puro (Ingrediente activo)	Sal de Glifosato-Isopropilamonio
Fórmula Molecular	C ₃ H ₆ N O ₅ P	C ₈ 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
Coficiente 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		

El glifosato entra a través de las hojas y es distribuido por las otras partes de la planta donde es menos metabolizado. Este no es selectivo para un tipo de planta en particular, por lo cual es el más utilizado en el mundo como herbicida (Gary M. Williams, 2000). Es usado comúnmente en el control y muerte de las gramíneas, plantas herbáceas, perennes de raíces profundas, maleza, algunos árboles y arbustos. Generalmente es utilizado en forma de sal, más comúnmente la sal de isopropilamina. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de una enzima de la vía del Shikimato (figura 2) llamada 5-enolpiruvilshikimato - 3 -fosfato-sintetasa. La inhibición de esta vía, exclusiva de las plantas, hace que se bloquee la síntesis del corismato, el cual es un intermediario de aminoácidos aromáticos indispensables para la formación de proteínas implicadas en el crecimiento y la supervivencia, estos aminoácidos aromáticos son (triptófano, fenilalanina y tirosina). Así mismo, el glifosato puede inhibir 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 causando daños irreversibles como la disminución de la producción de proteínas, su crecimiento y finalmente necrosis de los tejidos. (Bravo, 2004)

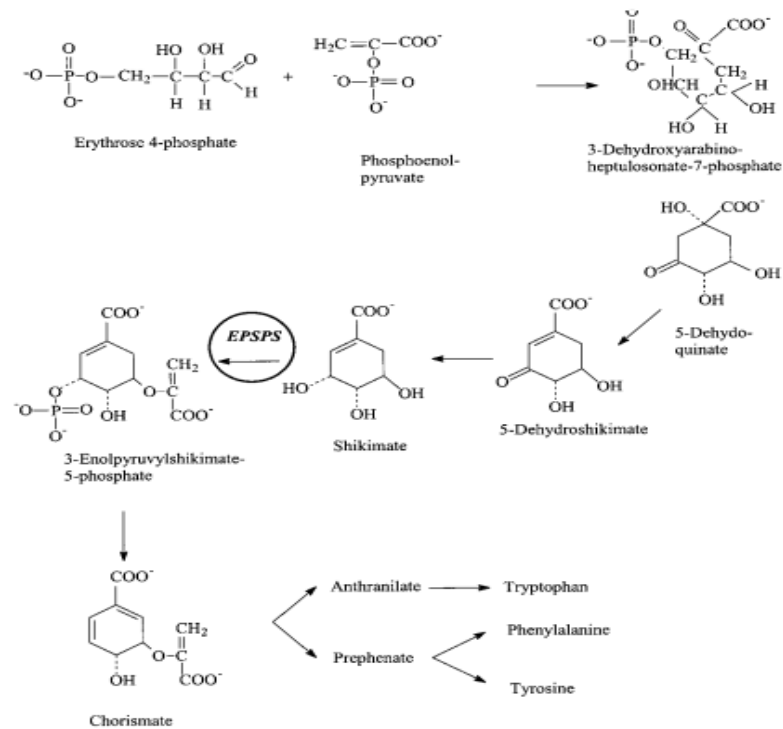


Figura 3. Efecto del glifosato en la ruta del ácido Shikímico en la plantas. (Bravo, 2004)

La mayoría de los organismos vivos no tienen esta ruta metabólica, por ende no serían afectados directamente por este herbicida. El problema subyace en las consecuencias ambientales debido a la contaminación de los suelos, puesto que se mantiene sin cambios en él durante distintos períodos de tiempo como

resultado de su adsorción sobre las partículas de arcilla y materia orgánica presentes en el suelo (Bravo, 2004).

También, se han asociado problemas de intoxicación de glifosato en animales en zonas donde se ha venido utilizando este herbicida a gran escala: ya sea por el consumo de agua contaminada por procesos de lixiviación, o por fenómenos asociados a la inadecuada higiene de alimentos a consumir expuestos a este. En las formulaciones de estos herbicidas, aparte de traer el principio activo (glifosato), también contienen tensoactivos, en este caso la polioxietilamina (POEA) siendo la más utilizada frecuentemente. Este tensoactivo se encuentra a una concentración que varía entre 6% y 18%, según los diferentes productos comerciales; además, este surfactante tiene asociada una categoría toxicológica III, teniendo en cuenta su *toxicidad aguda con base a la DL50* oral para las ratas, por lo cual tendría ciertas consecuencias dentro del organismo (Hadi, 2013).

En los últimos años las investigaciones sobre el efecto del glifosato en tierra fértil han ayudado a determinar el efecto que tiene este herbicida sobre las comunidades de microorganismos que viven en estas zonas donde se utiliza constantemente este agente químico. Para ello es importante saber que dependiendo del tipo de suelo y las condiciones ambientales, el glifosato tendrá efecto sobre la zona donde se aplique. En el caso de Colombia donde los suelos son de clima tropical el proceso de degradación de este herbicida es muy corto y esto es debido a que es adsorbido y fijado rápidamente; la arcilla, el sedimento y la materia orgánica se encuentran comúnmente en el suelo y la acidez o basicidad del mismo influyen en el tiempo en el que el principio activo de esta formulación (glifosato) se encuentre suspendido entre las partículas arenosas de la tierra y con ello su efecto sobre las comunidades microbianas que ahí se encuentren. (Castillo, 2012)

Si se observa la molécula del glifosato y las propiedades del suelo en el que se aplicó se podrá determinar si la adsorción será irreversible (no puede ser extraída del suelo) y la adsorción reversible, que llevara como consecuencia la movilidad y lixiviación de este compuesto a capas más profundas de la tierra y acuíferos afectando posiblemente a una gran mayoría de comunidades microbianas, por ejemplo la adsorción del glifosato está directamente relacionado con la cantidad de sitios ligadores de fosfato disponibles (ligado de la fracción de ácido fosfónico) por lo cual si un suelo es rico en fosfato va a haber menos posibilidad de crear lixiviados y de igual forma que las bacterias que se encuentren en este sitio no sean afectadas directamente o estas no alcancen a utilizarlo como fuente de carbono o fósforo. (Castillo, 2012)

En un estudio realizado por la universidad de los Andes en Bogotá, en Colombia encontraron que un 45% del glifosato es adsorbido por la planta y el 55% es dispersado en los alrededores de su aplicación. La disipación depende del tipo de suelo, la cantidad de formación de complejos con Ca^{2+} y Mg^{2+} , la degradación microbiológica y la solubilización en agua que puede tardar de 3 a 174 días en

campo. Estos mecanismo de degradación disminuye el 55% de ingrediente activo, pero el problema real se centra en el proceso de aplicación de la formulación, como se mencionó anteriormente en el caso de aspersión aérea hay una alta probabilidad de que este sea aplicado en zonas donde no se requiere su uso, de igual forma el viento puede transportar partículas a otras zonas. (Cuarán, 2005)

De acuerdo al último reporte de la Defensoría del Pueblo ya se han reportado cerca de 8.000 quejas, de las cuales el 87% corresponde a daños en las plantas, el otro porcentaje restante corresponde a problemas de salud humana y animal; cabe aclarar que estas declaraciones por parte de los habitantes que viven cerca a los lugares de aspersión del glifosato no están fundamentados en evidencia científica. (Cuarán, 2005)

De acuerdo a esta necesidad se diseñó un experimento en el cual se utilizó tierra fértil comercial y tres diferentes cantidades de glifosato (10mg, simulando una aplicación normal en suelos para agricultores, 100 mg que simula estudios en laboratorio para determinar la toxicidad del herbicida y 1000mg el cual sería un derramamiento en suelo del glifosato), con esto se pretende determinar a término de 30 días el efecto de este herbicida sobre las comunidades bacterianas mediante el conteo de unidades formadoras de colonia en un medio solido enriquecido; Los resultados se explican más adelante (ver graficas 4, 5 y 6). Debido a que el glifosato puede mantenerse aproximadamente 170 días en tierra, se decidió escoger una fecha limite (30 días) para la toma de las muestras, debido a que las bacterias sufren un proceso adaptativo por las condiciones de estrés en la que se encuentran, se asegura que a término máximo de 50 días el consorcio de bacterias presentes en esas muestras expresa un comportamiento exponencial permitiendo que este diseño de experimento obtenga resultados más confiables (Bott, 2011)

La biorremediación implica el uso de microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos, para degradar contaminantes orgánicos presentes en el ambiente, en compuestos más simples y de menor peligrosidad (tóxicos). Esta estrategia de descontaminación eficiente tiene una amplia aceptación pública y puede llevarse a cabo directamente en el lugar. La biorremediación es una forma relativamente de bajo costo para eliminar los contaminantes presentes en tierra o agua (Garzón, 2009). En la última década, se ha venido incrementado el uso de bacterias que son capaces de catabolizar compuestos como el glifosato, los cuales utilizan el carbono y fósforo como recurso vital para sus procesos metabólicos (Salmanian, 2013).

Las bacterias son, quizás, los organismos más versátiles y diversificados en cuanto a sus requerimientos nutricionales. Sin embargo, se reconoce que los microorganismos necesitan un tiempo determinado para obtener la capacidad de degradar todos los nuevos productos químicos sintéticos introducidos en el medio ambiente. Por lo tanto, mediante técnicas de identificación bioquímicas se espera aislar y clasificar cepas bacterianas con capacidad degradadora de glifosato.

Estos microorganismos, principalmente las bacterias, son capaces de catabolizar compuestos organofosforados, los cuales utilizan como fuente de energía el carbono, nitrógeno y fósforo, esenciales para su crecimiento (Salmanian, 2013). Las bacterias degradan el glifosato por dos vías, produciendo como intermediarios glicina o ácido aminometilfosfónico (AMPA), lo cual ha facilitado la cuantificación de glifosato mediante técnicas de HPLC acoplado a masas o cromatografía de gases.

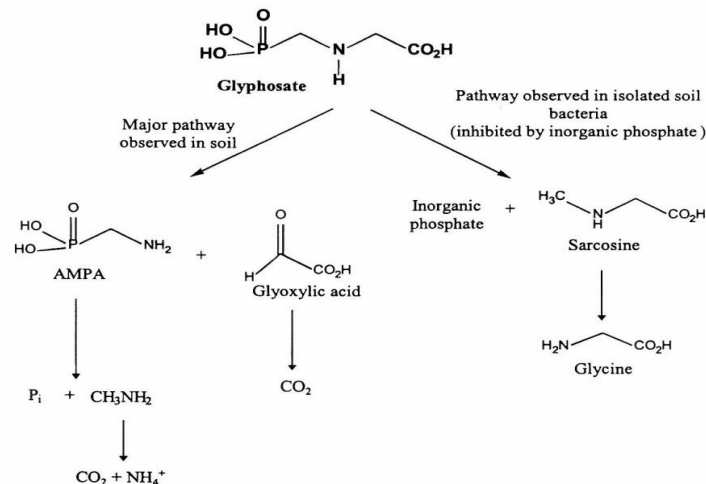


Fig. 2. Degradation pathway of glyphosate in soil. Adapted from Franz et al. 1997.

Figura 4. Degradación del glifosato en el suelo. (Bravo, 2004)

Las técnicas de aislamiento permiten la obtención de microorganismos a partir de muestras complejas como por ejemplo de suelo, de agua, de alimentos, etc. así como para comprobar la pureza de los cultivos obtenidos. La muestra, al provenir de un cultivo de caña de azúcar del Valle del Cauca, no permitirá asegurar que en ella se encuentre solo un tipo de bacteria y de igual forma que sea capaz de degradar el glifosato. Para tal fin se emplean técnicas de aislamiento que conduzcan a la obtención de un cultivo puro, como por ejemplo la separación física de los microorganismos mediante diluciones seriadas y siembra por vertido en placa, o la utilización de medios de cultivos selectivos. Se pretende utilizar medios de cultivo en donde el glifosato sea la única fuente de carbono o fósforo en el metabolismo de las bacterias. Con estos cultivos selectivos se podrá aislar los microorganismos candidatos para su respectiva identificación y caracterización (Nourouzi, 2011).

Al aislar las bacterias con capacidad degradadora de glifosato, se podrá realizar la cuantificación del glifosato. Esto con el fin de corroborar que las bacterias que crecieron en el medio de cultivo selectivo, son capaces de incorporar en su metabolismo este herbicida como fuente de carbono o fósforo. Por un lado, la

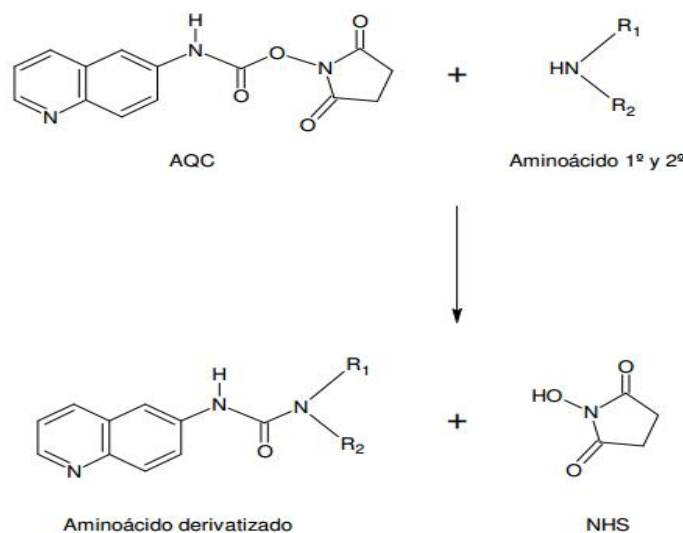
técnica a utilizar es cromatografía líquida de alta eficacia, esta es utilizada para separar los componentes de una mezcla ya que presenta una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil (cromatografía en fase reversa), que funciona de esta manera, los componentes de la solución emigran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna, es decir, de acuerdo a la polaridad de la muestra y la fase móvil este se desplazara en la fase estacionario separando los diferentes compuestos a eluir, estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar, que para este caso será el detector de UV a una longitud de onda de 250 nm. Por ello para cumplir con parámetros más específicos para la cuantificación del glifosato se utilizará la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a UV (HPLC-UV). Un detector de HPLC visible UV utiliza la luz para analizar muestras. Mediante la medición de la absorción de la muestra de la luz en diferentes longitudes de onda, el analito puede identificarse. Detectores HPLC-UV pueden ser utilizados por cualquier laboratorio usando HPLC. (Gorona Rampazzo Todorovic, 2013). Debido a que el glifosato no se puede detectar mediante UV, se debe realizar un proceso de derivatización precolumna.

La derivatización consiste en la transformación de un compuesto químico en uno de estructura química similar, pero con propiedades químicas diferentes. El glifosato es una molécula que no es detectada por los detectores UV o de fluorescencia, por ello se utiliza un compuesto derivatizante para que pueda ser determinado por la técnica HPLC.

La derivatización puede llevarse a cabo antes de la separación cromatográfica a la cual se conoce como precolumna o inmediatamente después de la elución denominada postcolumna. Debido a las condiciones del proyecto de grado la derivatización precolumna es la más indicada debido a las siguientes ventajas: se completa en un periodo de tiempo razonable y es cuantitativo, la reacción se puede desarrollar en un disolvente no compatible con la fase móvil utilizada en la separación cromatográfica, se pueden separar los productos secundarios formados, en la misma columna o antes de la separación cromatográfica. De igual forma cabe resaltar las comunes desventajas que presenta ya que deben ser tenidas en cuenta a la hora de interpretar los resultados, estas son las siguientes: presencia de picos interferentes en los cromatogramas debido al mismo reactivo, a productos de reacción, se recomienda eliminar el exceso de reactivo, disolvente u otros componentes de la mezcla de reacción antes de la inyección en el cromatógrafo, los aminoácidos pueden ser detectados directamente en el ultravioleta, ya que absorben a una longitud de onda entre 190-250 nm. Sin embargo, en esta región del espectro también absorben la mayoría de los disolventes y otros componentes de las muestras (Callejón, 2010).

El 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) es un derivatizante de grupos aminos, que ha sido diseñado principalmente para aminoácidos, este compuesto posee las siguientes ventajas: el exceso de reactivo no interfiere, da como resultado derivados estables y altamente fluorescentes, es muy sensible, su reacción es rápida, en muchas ocasiones con el UPLC los derivados se inyectan sin previa preparación de la muestra y las sales y detergentes de muestras no interfieren. (Callejón, 2010). Para ello se dispone de un kit "AccQ-Tag Ultra Derivatization Kit" de Waters el cual es utilizado en conjunto con el HPLC-UV. Este ofrece las siguientes características las cuales son: aumentar la sensibilidad (0.5-1.0 picomoles) y selectividad de los derivados formados, así mismo los rendimientos de la reacción evitando desperdicio de los compuestos químicos; se le atribuye también la posibilidad de trabajar con dos detectores, uno es el de fluorescencia y el otro UV. El AQC reacciona rápidamente con los aminoácidos primarios y secundarios formando productos altamente estables. Los derivados que resultan son estables a temperatura ambiente durante al menos una semana y se separan fácilmente por HPLC en fase reversa utilizando una columna C18 (Busto, 2010). Debido a que la molécula de glifosato tiene una amina secundaria, se espera que en conjunto con la sensibilidad del método se logre cuantificar la cantidad de este herbicida degradado por las bacterias.

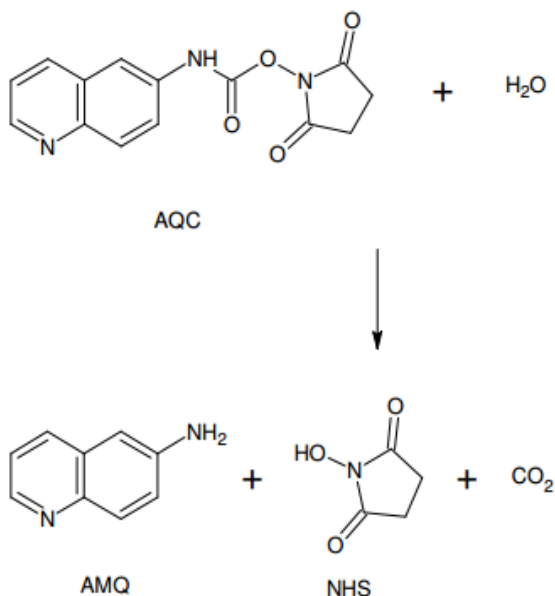
Figura 5. Reacción de derivatización del ACQ (Busto, 2010)



Hay que tener en cuenta que en este proceso de derivatización hay hidrólisis por la presencia de agua por ello el exceso del reactivo se hidroliza durante la reacción para formar 6- aminoquinolina (AMQ), cuyas características espectrales son diferentes a los aminoácidos derivatizados, lo cual permite programar una longitud de onda que maximice la respuesta de emisión de los derivados y

reduzca al mínimo la respuesta del AMQ, este producto refiere cierta desventaja al ser utilizado con un detector de UV, a 250 nm, el AMQ absorbe alrededor de 200 veces más que cualquiera de los aminoácidos derivatizados y esto puede ocasionar dificultades en la cuantificación cuando se utiliza diferentes tipos de aminoácidos, pero lo más importante es que este problema no es impedimento para el glifosato ya que se puede cambiar el pH para diferenciar los tiempo de retención en el cromatograma. (Callejón, 2010)

Figura 6. Hidrolisis del exceso de AQC. (Busto, 2010)



2.3 OBJETIVOS.

Objetivo general.

Identificar bacterias capaces de degradar glifosato a partir de una muestra de suelo de un cultivo de caña de azúcar.

Objetivos específicos

- Aislar las bacterias que crecen en medio con glifosato
- Determinar el efecto del glifosato sobre las comunidades bacterianas en tierra fértil.
- Cuantificar la cantidad de glifosato degradado por las bacterias encontradas.

2.4 METODOLOGÍA

2.4.1 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS

Las muestras fueron tomadas del banco de bacterias criopreservadas de la universidad Icesi, el cual contenían bacterias aisladas con potencialidad degradadora de glifosato. Estos consorcios de bacterias fueron aisladas previamente en el proyecto de grado de Stephania Angel. Se procedió a descongelar dos muestras, una donde el glifosato se utilizó como única fuente de carbono, muestra uno carbono (M1C), y otra en las que el herbicida lo utilizan como fuente de fósforo, muestra 2 fósforo (M2F). Posterior a esto, en 50 mL de medio enriquecido se agregó una punta estéril con muestra y se incubó durante siete días para su crecimiento.

Para el crecimiento bacteriano se utilizó el método de dilución en serie. Para ello se emplearon dos protocolos de crecimiento selectivo, denominados M1C (como única fuente de carbono) y M2F (como única fuente de fósforo). Ambas muestras se colocaron en Erlenmeyer a dos concentraciones diferentes de glifosato 1 g/L y 6g/L, esto con el fin de determinar a cual concentración se expresa un mayor número de colonias para su utilización en la determinación del herbicida mediante cromatografía líquida.

En el protocolo M1C se disolvió 1 ml de muestra en 9 ml de agua destilada y luego se realizaron diluciones en serie hasta 10^{-7} , las cuales se hicieron por triplicado. Posterior a ese proceso se realizó la siembra en placas de 0.5 mL de cada dilución en un medio selectivo. A un pH de 7.0, las muestras se incubaron a 30 °C durante siete días. Cabe aclarar que para la determinación de glifosato tanto para la muestra M1C y M2F se utilizó 6 g/L como concentración final. Los componentes del medio selectivo se observan en la siguiente tabla (3):

Tabla 3. Sales del medio selectivo sólido donde el glifosato es utilizado como fuente de carbono (M1C) (Oueded, 2013).

REACTIVO	CANTIDAD
KH_2PO_4	1,36 g/L
Na_2HPO_4	2,13 mg/L
NaCl	0,50 g/L
NH_4SO_4	0,50 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20 g/L
CaCl_2	0,01 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001 g/L
Glifosato	6,00 g/L y 1,00 g/L

A continuación en la tabla 4 se observan los componentes utilizados para el protocolo M2F:

Tabla 4. Sales del medio selectivo solido donde el glifosato es utilizado como fuente de Fosforo (M2F) (Ouided, 2013).

REACTIVO	CANTIDAD
KH_2PO_4	1,50 g/L
Triss Buffer	12,00 g/L
NaCl	0,50 g/L
NH_4SO_4	2,00 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20 g/L
CaCl_2	0,01 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001 g/L
Glifosato	6,00 g/L y 1,00 g/L
Glucosa	10,00 g/L

Este medio se utilizó a un pH de 7,0. Trascurrido los siete días de incubación se realizaron diluciones en serio hasta 10^{-7} de cada uno de los medios por triplicado, tomando 1 mL de muestra y depositándola en 9 mL de agua destilada; luego se realizó la siembra de 0.5 mL de cada dilución de medio selectivo. Las muestras se incubaron a 30°C por siete días.

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

Se realizó un recuento directo en placa para la determinación de la población microbiana. El conteo de unidades formadora de colonias (UFC) se llevó a cabo en la dilución 10^{-3} para el protocolo M1C y para el protocolo M2F en el medio selectivo 6 g/L de glifosato. Cabe resaltar que no se usó el microscopio óptico, puesto que el tamaño de las colonias permitió contarlas a simple vista.

EFECTO DEL GLIFOSATO SOBRE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN TIERRA FÉRTIL

Se diseñó un experimento basado en una investigación, el cual agregaron en la tierra fértil diferentes cantidades de glifosato para determinar su efecto sobre los microorganismos presentes (BÓRTOLI, 2012). Las muestras de suelo fueron tomadas de un producto comercial llamado "Tierra Fertil", luego se procedió en bandejas de plástico de 5 cm de altura x 10 cm de largo y 7 cm de ancho, agregar 500 g de tierra.

La adición del glifosato consistió en una única aplicación de una formulación

comercial de glifosato (Panzer, Indesa) de 10 mg (cantidad que simula la aplicación normal a campo por los agricultores), 100mg (cantidad que simula investigaciones para determinar toxicidad del mismo) y 1000 mg (cantidad que simula un derrame en campo) de ingrediente activo por kg de suelo, y un blanco sin agregado de herbicida. Se evaluó el crecimiento bacteriano mediante las unidades formadoras de colonia (UFC/mL) en tres momentos: 1, 10, 30 días posteriores a la aplicación del herbicida. La condición para el manejo de la tierra consistió en dejarlos los 30 días en cercanías del vivero de la universidad Icesi a la intemperie, cada tres días se regaba con agua. Para la toma de muestra, se tomó 10 g de tierra y se agregó en un Erlenmeyer de 250 mL que contenía 100 mL de agua destilada.

Para el conteo de las bacterias, se sembraron en medio enriquecido sólido que contenía lo siguiente: KH_2PO_4 , 1,36 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g/L; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L; $\text{CaCl} \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01g/L; así como elementos traza: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ mg /L, 5,0; $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mg /L; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mg /L; Na_2HPO_4 , 2,13mg /L y como fuente de carbono se utilizó Glucosa 10 g/L. A un pH de 7,0.

Se realizaron diluciones en serie hasta 10^{-7} de cada uno de los medios por triplicado, tomando 1 mL de muestra y depositándola en 9 mL de agua destilada; posteriormente se realizó la siembra de 1 mL de cada dilución de medio rico sólido. Las muestras se incubaron a 30°C por siete días.

CUANTIFICACIÓN DE DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO

Nota: para realizar la cuantificación del glifosato fue necesario realizar pruebas preliminares para verificar que el derivatizante 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) funcionada correctamente, para ello se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina (TLC).

Condiciones para la TLC

Los materiales empleados fueron el uso de la cámara cromatografica, placas de silica gel g de 10 x 10 cm, estufa y una cámara de Uv (366 nm). La fase móvil consistió en una mezcla de solventes de 50% de acetona y 50% de metanol.

Se utilizaron tres muestras, una es el derivatizante (ACQ), una segunda de glifosato más derivatizante, y un control del aminoácido cisteína más el ACQ, las cuales se dejaron correr en el sistema de solventes contenido en la cámara saturada aproximadamente hasta 7 cm. Una vez terminada la corrida se dejó evaporar en una estufa a 80 °C, el solvente para luego ser observado en la cámara UV a 366 nm.

Condiciones para HPLC-UV.

Curva de calibración

Se preparó 10 mL de una solución patrón de 100 ppm de glifosato en agua tipo I y se construyó una curva de calibración con cuatro concentraciones (0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.8 mg/mL).

Preparación de muestras para cuantificación de glifosato

Se tomó una colonia aislada de los dos medios de cultivo selectivo, M1C y M2F (medios con 6 g/L de glifosato), luego se depositó una punta con muestra en un litro de medio selectivo líquido, se incubó a 30°C por siete días en un shaker con agitación a 180 rpm; se tomó para realizar la determinación de glifosato tres muestras (días 1, 3 y 7) para luego ser corridas en el Hplc-UV, estas previamente centrifugadas. A continuación (Tabla 5) se encuentran las condiciones cromatograficas utilizadas para la determinación de glifosato.

Tabla 5. Condiciones cromatograficas del HPLC-UV.

Condiciones de detección HPLC	
columna	C18, 3.9 x 75mm de Waters
Fase móvil	Acetonitrilo/agua tipo 1, 60:40 v/v
Flujo	1.0 mL/min
Presión	1.100 PSI
Temperatura	30°C
Tiempo inyección	5 min.
Detección	Lámpara UV (250 nm)
Volumen de inyección, muestras.	5 µL
modo	Isocratico

Cuantificación del glifosato usando la técnica de HPLC-UV

Para la cuantificación del glifosato se utilizó la técnica propuesta por el kit “AccQ-Tag Ultra Derivatization Kit” de Waters

- ✓ Preparación del derivatizante.

Se reconstituyo el derivatizante ACQ marcado como “AccQ • Tag Ultra Polvo Reactivo”. Se llevó a 55°C en el vial 2A. Luego se agregó 1 mL del agente diluyente (2B) al vial 2A y se agito durante 10 segundos. Por último se calentó y agito hasta que se disolvió el polvo por 10 minutos.

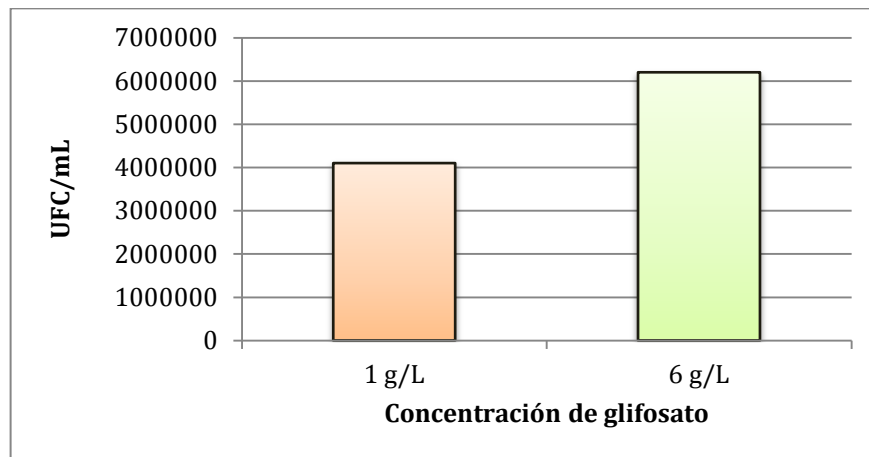
Proceso de derivatización.

Con una micropipeta se engregó 140 µL de AccQ • Tag Ultra tampón de borato en un vial de 1.5 mL. Posterior a esto se agregó 20 µL del estándar (para la curva de calibración) y respectivamente para la muestra. Se agito durante 30 segundos. Luego en este mismo vial se agregó 40 µL del derivatizante 2A “AccQ • Tag Ultra Polvo Reactivo”. Se aseguró y se agito durante 30 segundos, esta mezcla se calentó a 55 °C por 10 minutos. Se dejó enfriar para luego ser utilizado en el HPLC-UV.

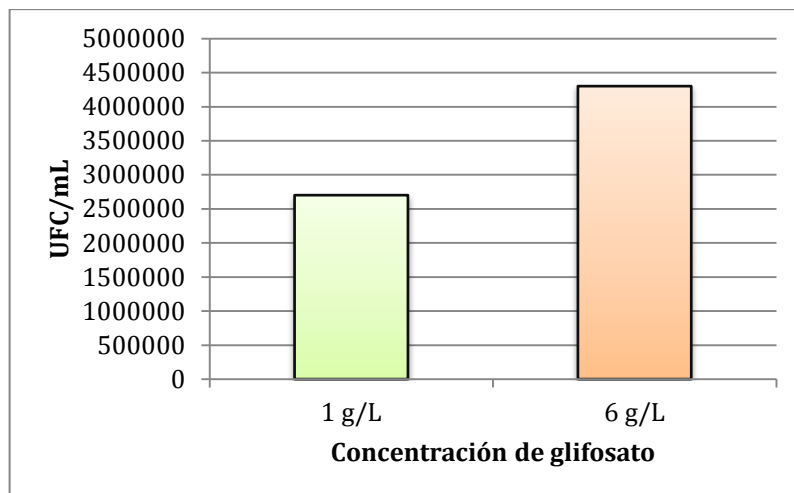
2.5 RESULTADOS

Evaluación de la tolerancia al glifosato

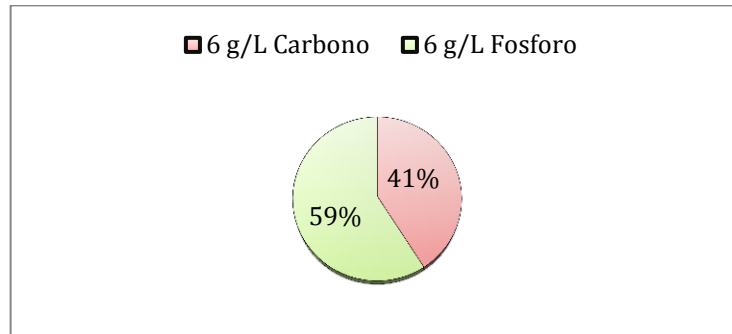
Con el objetivo de determinar la concentración óptima de glifosato en la cual se evidenciará un mayor crecimiento bacteriano, estas se sometieron a dos concentraciones de glifosato (1 y 6 g/L), para las muestras (M1C) y (M2F). En la gráfica uno se observa que, la concentración en la cual la bacteria presenta el menor crecimiento corresponde a 1 g/L de glifosato, mientras que a una concentración de 6 g/L se presenta el mayor crecimiento; los cultivos para estas bacterias se realizaron por triplicado. (Ver graficas 1, 2, y 3)



Gráfica 1. Evaluación del crecimiento bacteriano a dos concentraciones de glifosato donde se utilizó como única fuente de carbono (M1C).



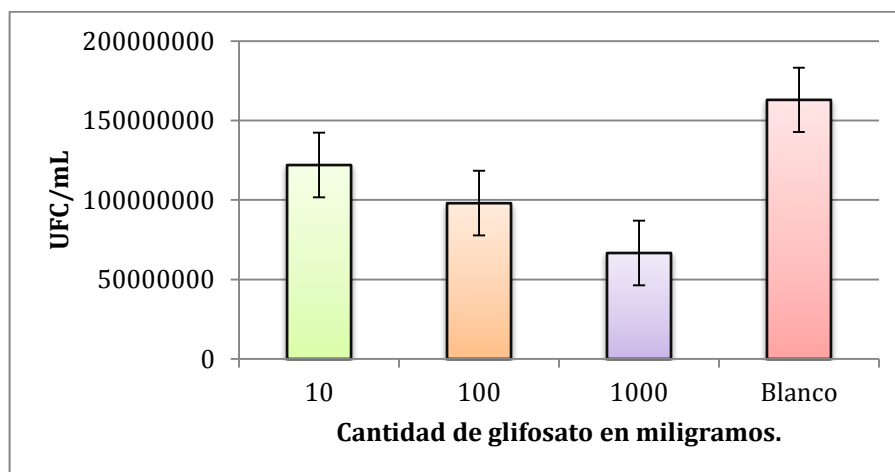
Gráfica 2. Evaluación del crecimiento bacteriano a dos concentraciones de glifosato donde se utilizó como única fuente de fósforo (M2F).



Gráfica 3. Comparación del crecimiento bacteriano a una concentración de glifosato en porcentaje.

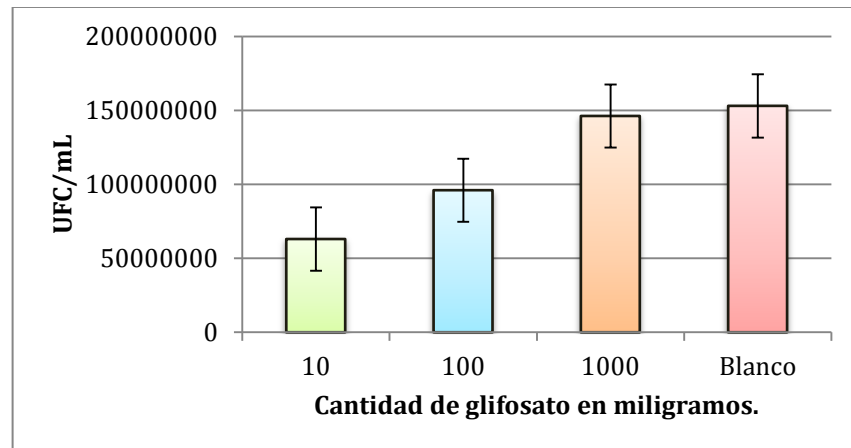
Evaluación del crecimiento bacteriano en tierra fértil expuesto a diferentes cantidades de glifosato en los días 1, 10 y 30.

Con el objetivo de determinar la cantidad de glifosato en la cual se evidenciará un mayor crecimiento bacteriano, se sometió las muestras a tres cantidades del herbicida (10 mg, 100 mg y 1000 mg) y un blanco como control. En la gráfica cuatro, día uno se observa que, la cantidad en la cual las bacterias presentan el menor crecimiento corresponde a 1000 mg de glifosato, mientras que a una cantidad de 10 mg se presenta el mayor crecimiento; el blanco presenta la mayor cantidad de UFC. Los cultivos para estas bacterias se realizaron por triplicado.

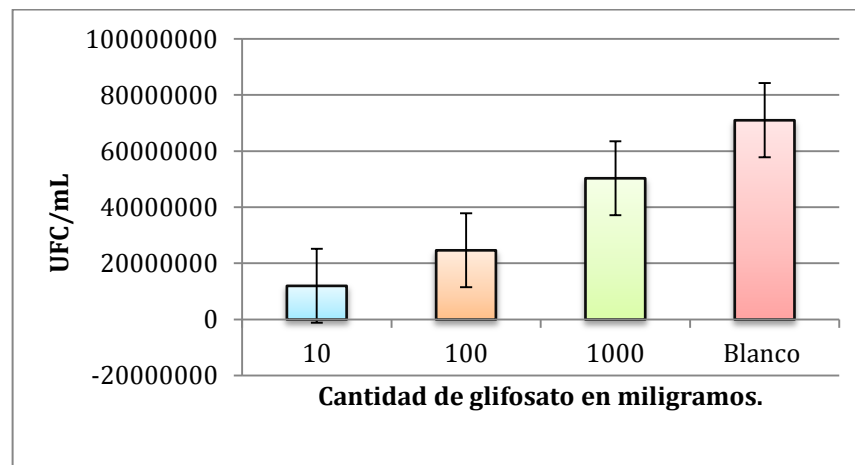


Gráfica 4. Evaluación del crecimiento bacteriano a tres cantidades de glifosato y un blanco para el día uno.

En la gráfica cinco y seis, día veinte y treinta respectivamente, se observa que, la cantidad en la cual las bacterias presentan el menor crecimiento corresponde a 10 mg de glifosato, mientras que a una cantidad de 1000 mg se presenta el mayor crecimiento; el blanco presenta la mayor cantidad de UFC.



Gráfica 5. Evaluación del crecimiento bacteriano a tres cantidades de glifosato y un blanco para el día veinte.



Gráfica 6. Evaluación del crecimiento bacteriano a tres cantidades de glifosato y un blanco para el día treinta.

Monitorización del derivatizante ACQ mediante cromatografía en capa fina.

Para evaluar el funcionamiento del derivatizante ACQ y realizar posteriormente la cuantificación mediante una derivatización pre-columna, se corrió en una fase móvil 50:50 de metanol y acetona, tres diferentes muestras (ver figura 7). Las bandas fueron observadas en una cámara de UV a 366 nm.

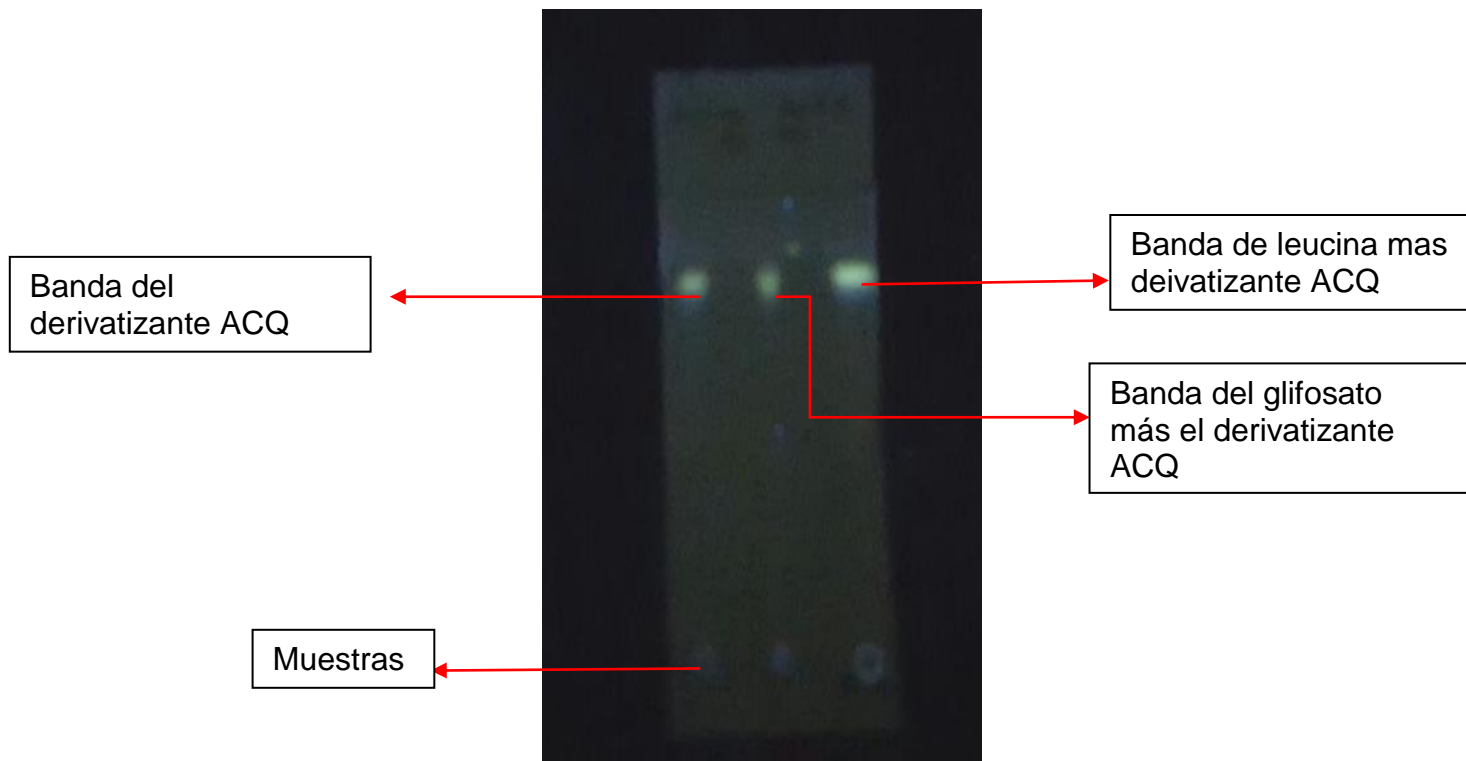


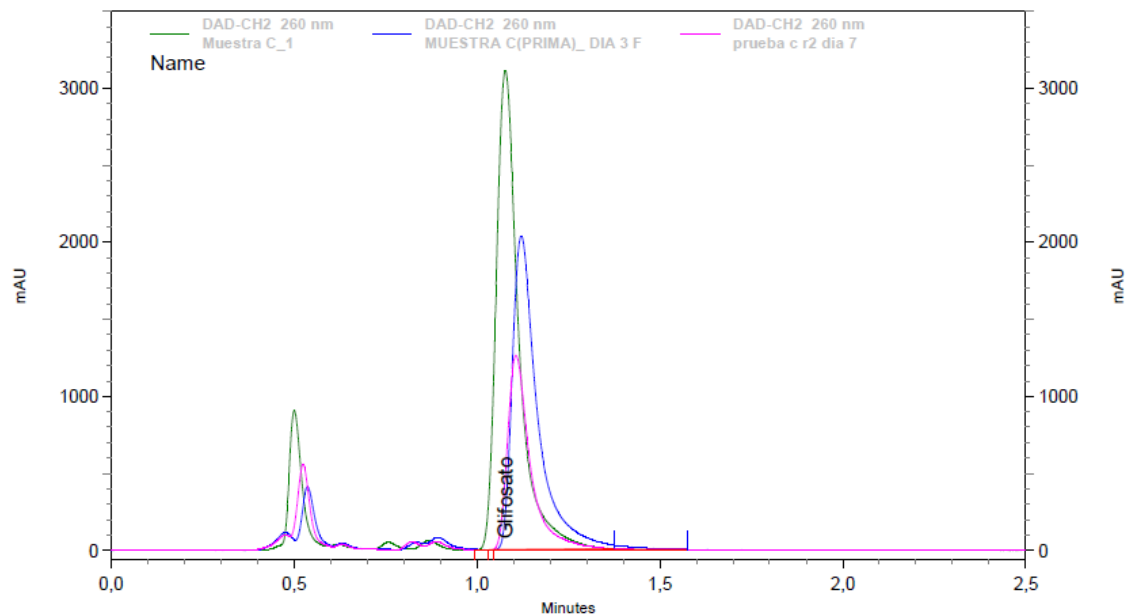
Figura 7. Cromatografía en capa fina del derivatizante, glifosato más derivatizante y leucina más derivatizante.

Cuantificación de la degradación de glifosato

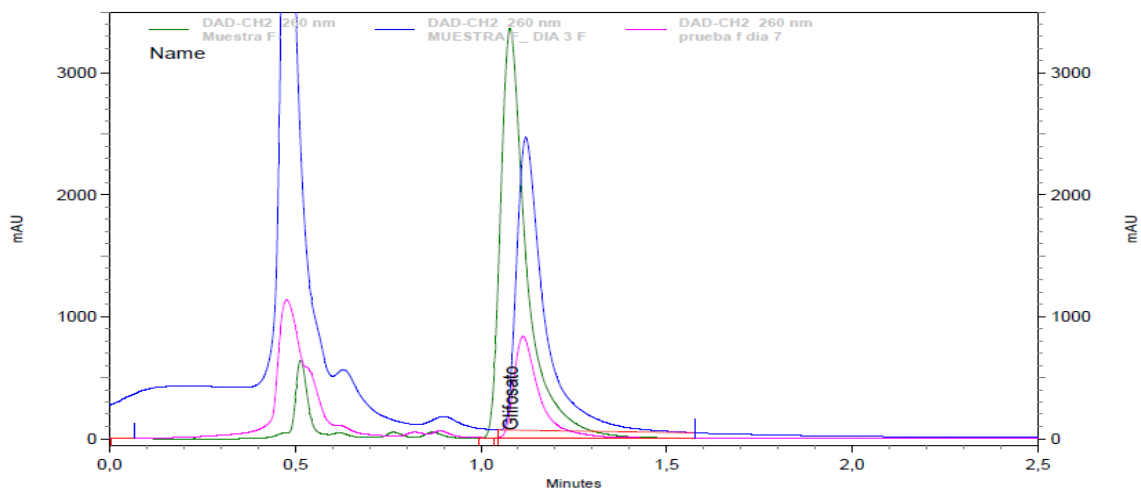
Se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de glifosato. La curva de calibración presentó un coeficiente de correlación de 0.980. Con la ecuación de la recta obtenida se determina la concentración de glifosato en el transcurso del tiempo. En el caso de la cuantificación de la degradación de glifosato se tiene la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 1. } y = 1,05874e-006x + 3,55751$$

Teniendo en cuenta que la concentración donde se tiene un mayor crecimiento bacteriano corresponde a 60 ppm de glifosato, se emplea esta para realizar la etapa de cuantificación. En la gráfica siete y ocho se observan dos cromatogramas, donde el glifosato se utilizó como única fuente de carbono (M1C) y como única fuente de fósforo (M2F) respectivamente, la variación de la concentración de glifosato durante un periodo de 7 días. Los resultados se observa en la tabla 5.



Gráfica 7. Variación de la concentración (60ppm) de glifosato en la muestra en un periodo de tres días; día uno, día tres y siete para la muestra (M1C).



Gráfica 8. Variación de la concentración (60ppm) de glifosato en la muestra en un periodo de tres días; día uno, día tres y siete para la muestra (M2F).

Día uno		Día tres	Día siete
Carbono (M1C)		Carbono (M1C)	Carbono (M1C)
Tiempo de retención	1.078	1,121	1,107
Area	53666483	40065722	22426635
Raw Amount	60.38	45,98	27,30
Platos teoricos	1670	1484	1751
Factor de capacidad	2.59	2,74	2,69
Resolución (USP)	0.00	0,00	0,00
Asimetría	1.72	2,15	1,95
Fosforo (M2F)		Fosforo (M2F)	Fosforo (M2F)
Tiempo de retención	1,079	1,121	1,113
Área	66074505	49511215	15879596
Raw Amount	73,51	55,98	20,37
Platos teoricos	1361	1360	1514
Factor de capacidad	2,60	2,74	2,71
Resolución (USP)	0,00	0,00	0,00
Asimetría	2,00	2,33	2,00

Tabla 6. Resultados cromatograficos arrojados por el Hplc-UV para las muestras (M1C) y (M2F) en los días uno, tres y siete.

Determinación del porcentaje de remoción

Ecuación 2.
$$\% RE = \frac{Ci - Cf}{Ci} * 100$$

Dónde:

Ci: concentración inicial de glifosato en ppm (mg/L)

Cf: concentración final de glifosato en ppm (mg/L)

- ✓ Para una concentración inicial de 60 ppm de glifosato, muestra (M1C) día uno:

$$\% RE = \frac{60 \text{ ppm glifosato} - 60.38 \text{ ppm glifosato}}{60 \text{ ppm glifosato}} * 100 =$$

$$\% RE = - 0.60 \%$$

Tabla 7. Resultados de la Cuantificación de la degradación de glifosato.

Disminución de glifosato por degradación biológica.	(M1C)	(M2F)
Día 1	-0.60 %	-21.92%
Día 3	23.40 %	6.70%
Día 7	54.50%	66.05%

Se logró obtener una importante remoción de glifosato por parte del consorcio de bacterias presentes en los tratamientos (M1C) y (M2F), ver tabla 6, por lo cual se infiere que la metodología de Hplc-UV mediante una derivatización pre-columna tiene un aceptable rendimiento a la hora de cuantificar el glifosato.

2.6 DISCUSIÓN

El glifosato es un herbicida ampliamente utilizado por los agricultores para el control en el crecimiento de las plantas, hasta llegar a la muerte; debido a que gran parte de este agente químico llega a la tierra y aguas cercanas al lugar de exposición, se ha evidenciado que no solo afecta a las plantas si no también a los otros seres vivos que conviven con ella, como por ejemplo bacterias, hongos y animales. Algunas investigaciones indican que el herbicida influye de manera positiva en el crecimiento bacteriano (dependiendo de la dosis), ya que puede suplir no solo las necesidades de carbono, sino también de fósforo que en su defecto, se encuentren tal vez en menor concentración en los lugares expuestos. Sin embargo, se hace referencia a pocas cepas con la habilidad de crecer en presencia de glifosato y otras en las cuales puede disminuir su crecimiento puesto que no toleran o degradan esta molécula.

Para el desarrollo del proyecto de grado, se utilizaron dos muestras, una donde el glifosato sirvió como fuente de carbono y otra de fosforo. La selección de estas muestras ya aisladas previamente por el proyecto de grado de la estudiante Stephania Ángel, garantizó que los microorganismos presentes degraden este herbicida, por ello se asume que la presencia de glifosato en el sitio de recolección de las muestras permitió el crecimiento de colonias bacterianas en el medio selectivo, lo que favoreció la expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo y el aislamiento de las nuevas colonias degradadoras de este compuesto.

Las dos muestras (M1C) y (M2F), se realizaron con el objetivo de estimar cómo era el crecimiento bacteriano, al exponerlas directamente en un medio selectivo sólido a dos concentraciones 1 g/L y 6 g/L de glifosato. La gráfica uno muestra el resultado del número de UFC/mL, donde el glifosato se utiliza como fuente de carbono; se evidencia un alto crecimiento en la concentración 6 g/L en comparación con la concentración de 1 g/L de glifosato. En el tratamiento donde el glifosato se utiliza como fuente de fosforo, grafica dos, se observó la misma tendencia en los resultados, en la mayor concentración, se contabilizaron un mayor número de colonias. Con esto se concluye que, el consorcio de bacterias que se encontraban en la (M1C) y (M2F) presentan la capacidad de crecer en el medio selectivo con la concentración mas alta; una explicación posible para este comportamiento esta directamente ligado a la cantidad de glifosato disponible para ser degradado por las bacterias, ya que al tener mayor cantidad de fosforo y carbono en el medio, favorece las condiciones para que haya un mayor número de unidades formadoras de colonia.

También se tiene que, al comparar los dos medios selectivos con muestras (M1C y M2F) a una concentración de 6 g/L (ver grafica 3), se obtiene que el medio donde las bacterias utilizan el glifosato como fuente de fosforo, hubo un mayor número de colonias que en las que utilizan como fuente de carbono; una posible explicación a este comportamiento encontrado se debe a las dos rutas de degradación del glifosato, una es el intermediario glicina o ácido aminometilfosfónico (AMPA) y la otra en menor proporción donde una liasa rompe el enlace C-P liberando fosfato inorgánico (Pi) y sarcosina, que posteriormente puede producir glicina (Yelena, 2013). Se menciona que, aquellas bacterias que degradan el AMPA lo utilizan como fuente de fósforo, lo cual indica que las bacterias que crecen en el medio selectivo con la muestra (M2F) siguen esta ruta metabólica; también se infiere que el AMPA es el metabolito principal de los procesos de biodegradación, por lo cual se infiere que debido a que esta molécula se encuentra en mayor cantidad en el medio, las bacterias posiblemente disponen de más fosforo para su crecimiento, esta conclusión se puede observar en el número de unidades formadoras de colonia que arrojó el medio con la muestra (M2F), donde supera en gran medida al medio selectivo que tenía el glifosato como fuente de carbono. Otros factores inherentes al número de unidades formadoras de colonia es la tasa de degradación del glifosato, que a su vez depende de la medida de la adaptación bacteriana al herbicida, el estado de fosfato de las células, y la fase de crecimiento del cultivo donde se procedió a contabilizarlas. (Yelena, 2013)

En este estudio se logró determinar el efecto que tiene el glifosato sobre las comunidades microbianas en tierra fértil mediante el conteo de unidades formadoras de colonia. Para ello se utilizaron tres cantidades de glifosato (10 mg, 100 mg y 1000mg) y un blanco. El tratamiento de menor cantidad (10 mg) fue seleccionado con el objetivo de simular una aplicación simple a la dosis recomendada a campos de agricultores. La cantidad de (100 mg) es recomendada en estudios de laboratorio para analizar el efecto de pesticidas sobre la microbiota del suelo y por último la máxima cantidad (1000 mg) representa un escenario de contaminación por derrame (BÓRTOLI, 2012) . La tierra en la cual se desarrolló este objetivo, no se le ha aplicado con anterioridad alguna cantidad de glifosato; al observar la gráfica cuatro, que corresponde al día uno, se evidencia que a mayor cantidad de glifosato menor es el número de colonias que lograron crecer. Ya en las gráficas cinco y seis para los días 20 y 30, el comportamiento es distinto, en la mayor cantidad del herbicida (1000mg), se obtuvieron un mayor número de unidades formadoras de colonia. En el transcurso del mes en el que se tomó las muestras, siempre se obtuvo un mayor número de colonias en el tratamiento "blanco".

En el tratamiento del día uno, a una cantidad 1000 mg de glifosato se lograron expresar pocas colonias comparado con el de 100 mg y esto es debido a que,

inicialmente estos microorganismos requieren necesariamente un período de aclimatación para inducir enzimas o metabolitos necesarios para su degradación y así, estas bacterias presentes puedan utilizar el glifosato como fuente de carbono y fósforo. Por ende muchas de las comunidades microbianas que no lo pueden hacer, son sensibles ante el efecto del herbicida y mueren. Como se mencionó anteriormente, los valores más altos de biomasa microbiana fueron observados a los 20 y 30 días de incubación del suelo a una cantidad de 1000 mg, hay que tener en cuenta que el glifosato puede estimular o inhibir la actividad de los microorganismos de la tierra dependiendo del tipo de suelo y la concentración de herbicida utilizado. A una cantidad de 1000 mg donde se creería que no crecerían bacterias debido a su nivel tóxico, fue donde se logró contabilizar un mayor número de colonias y esto es posible ya que el herbicida puede proveer los suficientes nutrientes (Carbono y Fósforo) para el crecimiento de las bacterias (BÓRTOLI, 2012)

Comparando los resultados de los días 20 y 30, se obtiene una disminución en las UFC para los cuatro tratamientos en el último día de muestreo. Este comportamiento se debe a que posiblemente las bacterias que se encuentran en este tipo de suelo, hayan degradado gran parte del glifosato y por ende se encuentren menos nutrientes para su crecimiento. En los diferentes días el tratamiento blanco siempre obtuvo un mayor número de unidades formadoras de colonia, es decir que, el glifosato tiene un efecto considerable sobre las comunidades bacterias que se encuentren en la tierra fértil, por lo cual se recomienda realizar estudios con técnicas como la cromatografía líquida o espectroscopia de masas para verificar la cantidad de glifosato que pueden remover.

Cabe mencionar que, para realizar la determinación del glifosato primero se monitoreo mediante cromatografía en capa fina el derivatizante ACQ con el glifosato y un aminoácido control (leucina). Los resultados obtenidos (ver figura 7) demuestran que el compuesto derivatizante funciona correctamente, a pesar de que no se revelo la presencia del compuesto derivatizante con el glifosato ni con el aminoácido, que ronda los 260 nm. Esta técnica se utilizó porque es rápida y sencilla de realizar, debido a que la universidad cuenta con este recurso se eligió este método para el monitoreo.

Para continuar con la siguiente fase propuesta (cuantificación), se trabajó únicamente con la concentración 6 g/L de glifosato por las siguientes razones: primero, porque el hecho de que se obtuvieran un mayor número de unidades formadoras de colonia, lo cual es un buen indicativo de su capacidad degradadora; segundo, porque tanto para los tratamientos donde el glifosato se utilizó como fuente de carbono y fósforo, siempre se obtuvo un mayor número de bacterias a la concentración de 6 g/L que a 1 g/L. Para realizar la determinación del glifosato, se utilizó el Hplc-UV como opción final, debido a que las condiciones (disponibilidad de equipos y materiales) eran propicias para su desarrollo.

Como se ha mencionado anteriormente, la ausencia de grupos cromóforos o fluoróforos en la estructura de glifosato imposibilita el uso de muchas técnicas para la cuantificación del glifosato. Por ello se procedió a realizar el proceso de derivatización pre-columna con el compuesto químico 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC), el cual para determinar su funcionalidad con aminas secundarias, se utilizó la técnica de cromatografía en capa delgada, (ver figura 7) en el cual se obtuvo una banda con el mismo R_f para las tres muestras. Esto se puede explicar con la longitud de onda que absorbe el compuesto control y las muestras derivatizadas; por lo general las aminas primarias y secundarias derivatizadas absorben a una longitud de onda de 200-250 nm, pero la cámara UV utiliza dos longitudes (longitud corta y larga) y en ninguna de ellas se observó una banda distinta. Con esto se logró inferir que el derivatizante puede funcionar con el glifosato ya que esta molécula tiene una amina secundaria que puede reaccionar y formar el complejo (ver figura 5). Por ello se procedió a utilizar el kit "AccQ-Tag Ultra Derivatization Kit" de Waters con la técnica de Hplc acoplado a UV.

Cabe recordar que, la cromatografía es básicamente un método de separación, lo cual lo hace muy útil para el desarrollo de muchas investigaciones. Esta fue la técnica utilizada para la determinación del glifosato en una muestra el cual contenía bacterias con capacidad degradadora de este herbicida.

Desde el punto de vista técnico de esta metodología, el tiempo de retención es el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la muestra máxima, para este caso, el tiempo de retención del glifosato ya derivatizado ronda los 1.1 minutos, para verificar este dato se realizaron varias pruebas del estándar de glifosato más el ACQ para acondicionar el Hplc-UV (ver tabla 3), el cual siempre arrojó el mismo tiempo de retención para las corridas del estándar y muestra. De acuerdo a los resultados obtenidos, la asimetría de los picos estuvieron por fuera de los valores aceptables (0,9 y 1,5) ya que en la mayoría de los cromatogramas, el valor promedio fue una simetría de 2, es decir, se obtuvo coqueo en los resultados (ver tabla 4). Tanto el área como el número de platos teóricos, están dentro de las especificaciones, por lo cual se puede inferir que los resultados obtenidos por el Hplc-UV pueden ser reproducibles. Cabe aclarar que para el desarrollo de este objetivo, se utilizó un derivatizante que no ha sido reportado previamente en conjunto con el glifosato, por lo cual se recomienda hacer un proceso de validación y estandarización para este método, ya que muchas de las condiciones utilizadas para el funcionamiento de esta técnica fueron realizadas a ensayo y error, por ello hay que tener en cuenta factores tales como la composición, fuerza iónica, pH y la temperatura, así como la velocidad del flujo, dimensiones de la columna y presión del sistema, eso se sugiere con el fin de mejorar el coqueo en los cromatogramas. Con esto se podría realizar un nuevo proyecto de grado que defina las condiciones exactas en que se deben utilizar para hacer reproducible la derivatización del glifosato con el compuesto químico 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC).

Durante la cuantificación, no se toma en cuenta los picos producidos por disolventes y reactivos o generados por la fase móvil o la matriz de la muestra. En los cromatogramas se muestra siempre varios picos, el cual corresponde al exceso del derivatizante presente en las muestras, por ello se recomienda utilizar una menor cantidad del derivatizante para evitar interferencias.

En este estudio se logró verificar la capacidad degradadora de un consorcio de bacterias, mediante cromatografía líquida con un detector UV, al evaluar la variación de la concentración de glifosato en un periodo de 7 días (ver gráficas siete y ocho.), partiendo de una concentración inicial de 60 ppm de este herbicida. En estos resultados se observa que en el transcurso de los días, la concentración inicial de glifosato que contenía el medio de cultivo selectivo líquido disminuyó considerablemente, tanto para la muestra en que el herbicida es utilizado como fuente de carbono y de fósforo. Las cepas que utilizan el glifosato como fuente de carbono removió aproximadamente a los siete días el 54.50% en la muestra. En el caso donde las bacterias utilizan el glifosato como fuente de fósforo, se removió aproximadamente al final del ensayo un 66.06%.

Por otra parte, al comparar los resultados de las muestras M1C y M2F, se corrobora que el consorcio de bacterias que utilizan el glifosato como fuente de fósforo están más adaptadas a la hora de realizar el proceso de biodegradación debido a que hay una diferencia aproximada del 10% en la capacidad de la remoción de este herbicida. Cabe considerar que cuando se realizó la siembra en medio sólido selectivo a esta misma concentración (60 ppm), el tratamiento marcado como (M2F) presentó un mayor número de colonias comparado con el tratamiento (M1C), por lo cual también se puede inferir que hay una mayor capacidad adaptativa por parte del consorcio de bacterias que utilizan el glifosato como fuente de fósforo.

Uno de los objetivos del proyecto estaba orientado a realizar la identificación de las posibles bacterias degradadoras de glifosato, pero debido a que durante la fase experimental hubo retrasos en cuanto al cumplimiento del objetivo del proyecto concerniente a la determinación del herbicida, no se tuvo a tiempo los resultados de la degradación, los cuales eran decisivos para determinar qué tan conveniente era realizar la inversión de tiempo y dinero para identificar a nivel molecular que cepas bacterianas pueden ser utilizadas en la biodegradación del glifosato.

Teniendo en cuenta que hoy en día ya se han descrito varias cepas que degradan glifosato, sería un aspecto muy importante en futuros estudios para poder determinar cuáles cepas bacterianas se encuentran en los medios de cultivo selectivo, donde el glifosato se utiliza como fuente de fósforo y carbono, y ver si hay diferencias en el consorcio de bacterias encontradas para cada tipo de tratamiento (M1C) y (M2F). Esto se podría realizar ya que se encontró un alto grado de remoción de glifosato por parte de estas bacterias. Dada la importancia del glifosato en el control de algunas plantas en el mundo, es necesario que se

sigan generando estrategias de biorremediación a través de estudios científicos encaminados a mejorar las condiciones de vida tanto los organismos objetivo y no objetivo (animales, hongos, otro tipo de plantas etc). Debido a que el consorcio de bacterias que ya han sido expuestas a un estrés (Medio de cultivo selectivo, glifosato), toman un comportamiento natural frente a este herbicida u otro agente químico es viable su utilización en campo ya que las comunidades bacterianas sufren cambios moleculares y fenotípicos que ocurren sin modificación del material hereditario (sin variación del genotipo), esto debido a diversos mecanismos de regulación de la expresión de los genes que conlleva a la generación de nuevos metabolitos y enzimas para degradar su alimento (Bott, 2011), este tipo de cambios aseguran que cuando sean expuestos al glifosato, de nuevo generen los recursos necesarios para su degradación. A la hora de aplicar estas bacterias a campo, luego de su identificación, se pretende que en el laboratorio las bacterias crezcan y luego sean esparcidas o inyectadas en los campos donde sean útiles para la degradación del glifosato

2.7 CONCLUSIONES

1. Los resultados del presente estudio mostraron que, la aplicación de cantidades altas de glifosato puede alterar la actividad de las comunidades microbianas que crecen en tierra fértil, aunque dicho efecto fue menos acentuado y consistente en las concentraciones más bajas debido un menor número de UFC/mL.
2. Se determinó que las bacterias que utilizan el glifosato como fuente de carbono removieron aproximadamente el 55.0% del herbicida presente en la muestra; y las bacterias que utilizaron el glifosato como fuente de fósforo lo removieron aproximadamente en un 66%, por lo cual da buenos indicios de la capacidad biodegradadora de estas bacterias y de su posible utilización en técnicas de biorremediación

2.8 RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores, se recomienda desarrollar proyectos de grado con las muestras (M2F) y (M1C) ya aisladas, y realizar como objetivo principal la identificación, para poder optimizar las condiciones de crecimiento y lograr tener mejores resultados. Por otro lado, es importante que durante el desarrollo en la determinación de glifosato, se encuentren ya estandarizadas y validadas los parámetros (temperatura, tiempo de reacción, pH, etc) para la utilización del derivatizante ACQ junto con el glifosato mediante la técnica de Hplc-UV, para así ser reproducible en futuras investigaciones y garantizar que los resultados obtenidos sean más reales y justificados.

2.9 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, El Sevier*, 157– 165.
- Arcila, F. V. (2000). Uso de madurantes. *Cenicaña*, 30.
- 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.
- BÓRTOLI, P. V. (2012). Efectos del herbicida glifosato sobre la estructura y el funcionamiento de comunidades microbianas de dos suelos de plantaciones de olivo. *Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal*, 3-7.
- Bott, S. e. (2011). Phytotoxicity of glyphosate soil residues re-mobilised by phosphate fertilisation. *Springer*, 249-256.
- Bravo, E. (2004). Ficha Técnica Glifosato. *Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina (RAP-AL)*, 10.
- 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*.
- Busto, O. B. (2010). ESTUDIO SOBRE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS POR HPLC . *Universitat Rovira*, 29.
- 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.
- Callejón, R. (2010). Desarrollo de un método de HPLC para la determinación de aminoácidos en vinagre y su validación en muestras reales. *Universidad de Sevilla, facultad de Farmacia* , 32.
- Campos, F. e. (2012). Response of Eucalyptus (*Eucalyptus urograndis*) Plants at Different Doses of Glyphosate. *Journal of Agricultural Science*, 66-72.
- Castillo, M. E. (2012). MOVILIDAD DE GLIFOSATO EN EL SUELO, AGUA DE ESCURRIMIENTO, PERSISTENCIA Y DAÑO EN EL TEJIDO VEGETAL DEL SISTEMA DE CULTIVO PASTO - MAÍZ, EN SUCUMBÍOS. *UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE*, 36.
- Choong, T. (2011). Glyphosate Utilization as the Source of Carbon: Isolation and Identification of new Bacteria. *E-Journal Of Chemistry*, 1582-1587.
- Cuarán, H. G. (2005). Glifosato: Riesgo humano? *APUNTES CIENTÍFICOS UNIANDINOS* , 5.
- Decreto, C. N. (2009). EVALUACIÓN DE LA INFORMACIÓN CIENTÍFICA VINCULADA AL GLIFOSATO EN SU OCURRENCIA SOBRE LA SALUD HUMANA Y EL AMBIENTE. *Ciudad Autónoma de Buenos Aires*, 4.

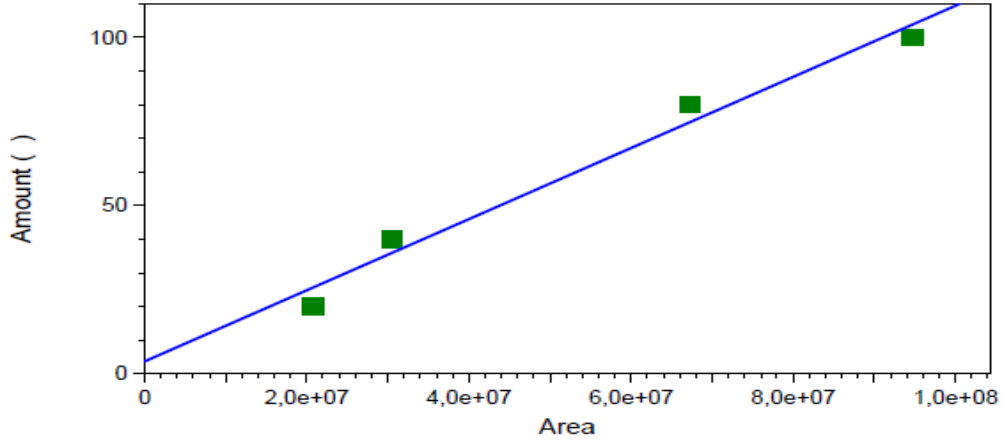
- Dinham, B. (2009). *Glifosidio*. Recuperado el Noviembre de 2013, de <http://www.glifocidio.org/docs/impactos%20generales/ig1.pdf>
- Ermakova, I. T. (2010). Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. *Environmental Biotechnology*, 587-594.
- García Jaramillo, L. (2012). Exitos moderados y extravíos permanentes de la política antidrogas en Colombia . *Revista de Economía Institucional*, 7.
- Gary M. Williams, R. K. (2000). Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup1 and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 7.
- Garzón, J. D. (2009). Aproximaciones biológicas y isicoquímicas en el tratamiento de contaminantes: un resumen del aporte de la Universidad de los Andes. . *Revista de Ingeniería.*, 9.
- Ghosh, T. C. (2010). Bioremediation of Xenobiotics-contaminated Sites: Concept and Selected Case Studies. En m. h. Fulekar, *Bioremediation Technology* (págs. 10- 16). Springer.
- González Curbelo, M. Á. (2012). Sample-preparation methods for pesticide-residue analysis in cereals and derivatives. *Trends in Analytical Chemistry*, 32-40.
- Gorona Rampazzo Todorovic, A. M. (2013). Determination of Glyphosate and AMPA in Three Representative Agricultural Austrian Soils with a HPLC-MS/MS Method. *Copyright © Taylor & Francis Group, LLC*, 12.
- Hadi, F. M. (2013). New bacterial strain of the genus *Ochrobactrum* with glyphosate-degrading activity. *Journal of Environmental Science & Health, Part B -- Pesticides, Food Contaminants, & Agricultural Wastes.*, 7.
- 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.
- Hernández, A. A. (2011). Control de malezas y fitotoxicidad al maíz transgénico RR con dos formulaciones de glifosato. *Zamorano, Honduras*, 25.
- 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.
- 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*, 654-657.
- Kryuchkova, Y. (2013). Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. *Microbiological Research, Elsevier*, 1-7.

- 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.
- LIM, M. M. (2011). Glyphosate Utilization as the Source of Carbon: Isolation and Identification of new Bacteria. *E-Journal of Chemistry*, 6.
- Londoño Zapata, N. (2006). Lo Ambiental y lo Social de la Asperción el Colombia ¿Política Ambiental o Estrategia Antinarcóticos? *Desafíos*, 197-201.
- Luz Edith Barba-Ho, M. B. (2011). BIODEGRADABILIDAD Y TOXICIDAD DE HERBICIDAS UTILIZADOS EN EL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR. Facultad de Ingeniería «EIDENAR», 7.
- 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.
- Mendoza, M. d. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España., 6.
- Merchán, F. A. (17 de Noviembre de 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.
- Nourouzi, M. M. (2011). Glyphosate Utilization as the Source of Carbon: Isolation and Identification of new Bacteria. *E-Journal of Chemistry*, 6.
- Oirtiz, S. (2005). *Apuntes Científicos Uniandinos*. 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.

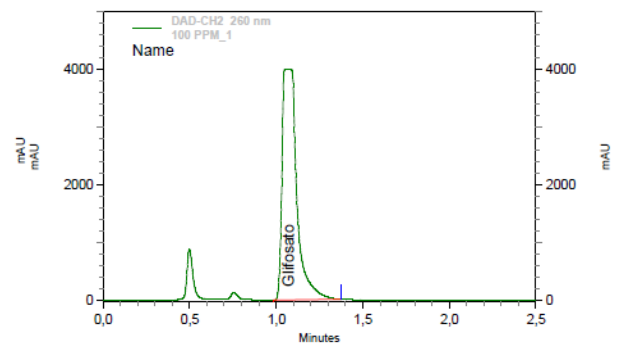
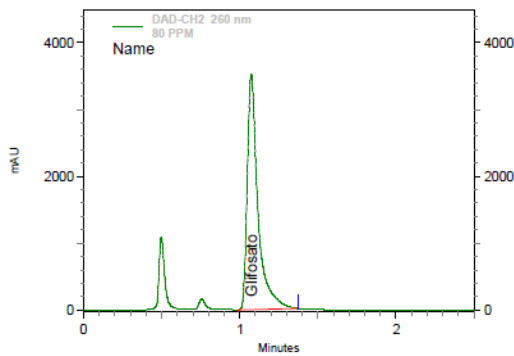
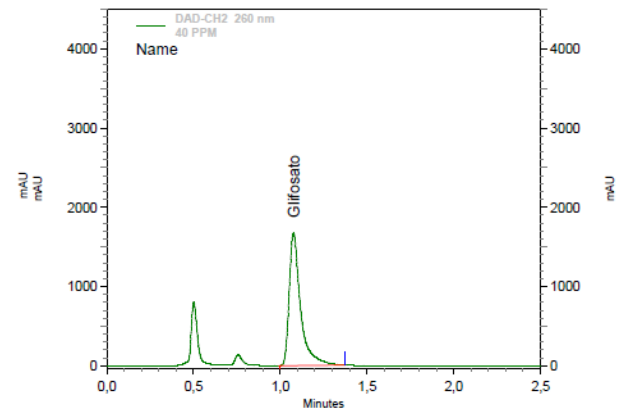
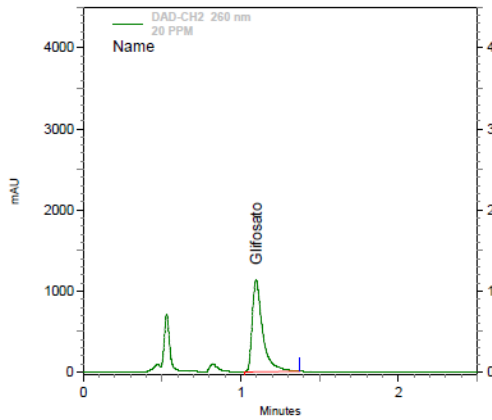
- Patricia Martínez- Nieto, J. B.-C. (2012). TOLERANCIA Y DEGRADACION DEL GLIFOSATO POR BACTERIAS AISLADAS DE SUELOS . *Revista Pilquen • Sección Agronomía •*, 8.
- Pérez, R. G. (2002). *Microbiología. Bacteriología. Medios de Cultivo y Pruebas Bioquímicas Micología General Parasitología General*. (Segunda Edición ed., Vol. Tomo II). Madrid: Paraninfo.
- Pintado, S. (2012). Electrochemical Determination of Glyphosate in Waters Using Electrogenerated Coppe Ions. *Int J Electrochem*, 2523-2530.
- Saenz Soto, J. (2009). MADURADORES Y SU COMPORTAMIENTO EN EL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR. *Tecnicaña*, 22.
- Salmanian. (2013). New bacterial strain of the genus Ochrobactrum with glyphosate-degrading activity. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 6.
- Salzar López, N. J. (2011). Herbicida Glifosato: Usos, Toxicidad Y Regulación. *Biorevista Técnica*, 23-27.
- 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.
- Santambrosio, E. (2009). *Preparación de medios de cultivo*. Buenos Aires, Argentina: Universidad Tecnológica Nacional, Departamento de Ingeniería Química.
- Santander, U. I. (2011). Implementacion de una metodologia para la determinacion de glifosato en muestras de agua. *Escuela Nacional de Cromatografía*, 36.
- 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.
- Sirinathsinghi, E. (2012). Glyphosate Hazards to Crops, Soils, Animals, and Consumers. *Institute of Science in Society*.
- Thomas, C. (2011). Glyphosate Utilization as the Source of Carbon: Isolation and Identification of new Bacteria. *E-Journal of Chemistry*, 1583-1587.
- Yelena, K. (2013). Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, Enterobacter cloacae K7. *ELSEVIER*, 2-4.
- Zobiolo, 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

Anexo 1 .Curva de calibración con 4 concentraciones de glifosato, para determinar la degradación biológica de 60 ppm del herbicida.



Anexo 2. Cromatogramas de la curva de calibración (20 ppm, 40 ppm, 80 ppm y 100 ppm).



Anexo 3. Espectro del UV del glifosato derivatizado con el ACQ.

