

25. Medio Ambiente

Estudio del aislamiento de bacterias degradadoras del herbicida N-fosfometilglicina o glifosato

Masotti, Fiorella; Gottig, Natalia; Ottado, Jorgelina

masotti@ibr-conicet.gov.ar ; gottig@ibr-conicet.gov.ar; ottado@ibr-conicet.gov.ar

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Resumen

El glifosato o N-fosfometilglicina ($C_3H_8NO_5P$) es utilizado en la agricultura como un herbicida foliar de amplio espectro para el control de las malezas. En nuestro país su uso extensivo ha aumentado a lo largo de los años y a pesar de que se han realizado numerosos estudios acerca de su incidencia sobre la salud humana y los ecosistemas, la mayoría de los resultados, son a veces, controversiales. En este contexto, resultaría útil contar con herramientas que permitan detoxificar el glifosato de los ambientes naturales a través de la biorremediación. Es por ello, que en este trabajo se propone aislar y estudiar nuevas bacterias capaces de utilizar al glifosato como sustrato para su crecimiento y, de esta forma, disminuir su presencia de las fuentes naturales en las que se encuentra. Se obtuvieron muestras de tierra a partir de campos con historia de repetidas fumigaciones con el herbicida. A partir de éstas, se obtuvieron 72 aislamientos bacterianos que fueron identificados por espectrometría de masas y/o secuenciación del ARNr 16S. Además se evaluó en estas cepas la velocidad y capacidad de crecimiento en presencia de glifosato como única fuente de fosfato o de carbono y a pesar de que todas las bacterias pudieron crecer utilizándolo, algunas lo realizaron de forma más eficiente que otras.

En resumen, estos resultados contribuirán al estudio de la degradación del glifosato por parte de la microbiota natural del suelo y al posible uso de estos microorganismos en procesos de biorremediación.

Palabras clave: Glifosato, biorremediación, microbiota.

Introducción

El glifosato o N-fosfometilglicina ($C_3H_8NO_5P$) es un miembro del grupo de compuestos químicos denominados ácidos fosfónicos o fosfonatos caracterizados por el enlace C-P, que es utilizado en la agricultura como un herbicida foliar de amplio espectro para el control de las malezas. El glifosato es la única molécula capaz de inhibir la enzima 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintetasa (EPSPS) de la vía shikimato de plantas en forma eficiente. Es un análogo del fosfoenolpiruvato, uno de los sustratos de esta enzima, que interviene bloqueando la vía de la síntesis de aminoácidos, provocando la muerte de las plantas (Duke y Powles, 2008).

La molécula del glifosato ha sido descubierta y patentada en primer lugar por la empresa Monsanto en 1970 (Jeffery, English y Connel, 1981). Sin embargo el uso masivo de este herbicida, el cual se ha convertido en el más utilizado alrededor del mundo, se debe a la introducción de cultivos genéticamente modificados (GM), resistentes a este compuesto (Pollegioni y Siehl, 2011). Argentina es el tercer productor mundial de este tipo de cultivos, después de Estados Unidos y Brasil y, en la actualidad, prácticamente el 100% de la superficie de soja, algodón y maíz es sembrada con variedades GM (Trigo, 2016).

Hoy en día, numerosas empresas producen herbicidas que contienen

glifosato bajo distintos nombres registrados. La mayoría de ellos se comercializan en forma de sales (amónicas, potásicas, isopropil amónicas, etc.) e incluso se adicionan otros compuestos denominados como inertes y coadyuvantes tales como los agentes surfactantes, que permiten aumentar la capacidad de penetrar las células vegetales, aumentando así su toxicidad. Como resultado, los efectos producidos por compuestos que contienen glifosato difieren ampliamente entre los distintos estudios realizados (Mesnage, Dfarge, Spiroux y Séralini, 2015).

Desde el enfoque ambiental, el glifosato tiene una gran capacidad de unirse fuertemente al suelo por lo cual tiene baja movilidad y poca probabilidad de alcanzar el agua subterránea. Sin embargo, en suelos porosos el glifosato puede moverse con facilidad (Duke y Powles, 2008). Además, tiene un tiempo de vida media relativamente bajo debido a que la microbiota del suelo es capaz de degradarlo. Muchas bacterias Gram positivas, Gram negativas, micromicetos, hongos superiores e incluso levaduras son capaces de biodegradar fosfonatos eficientemente (Sviridov, Shushkova, Zelenkova y Leontievsky, 2012). Se han reportado varios trabajos en los que se han aislado bacterias de lugares expuestos a la fumigación con glifosato que son resistentes a este compuesto. Entre ellas se encuentran: una cepa de *Bacillus cereus*, CB4 (Fan *et. al.*, 2012);

Enterobacter cloacae, K7 (Kryuchkova *et. al.* 2014), cepas de *Pseudomonas* GA07, GA09 y GC04 (Zhao *et. al.*, 2015) y algunas cepas correspondientes al género *Achromobacter* y *Ochrobactrum anthropi* (Sviridov *et. al.*, 2012). Por lo general, estas bacterias poseen al menos una de las dos vías de degradación de este compuesto.

Desde su introducción, el glifosato ha sido considerado como un pesticida seguro desde el punto de vista ambiental y toxicológico, ya que las EPSPS sólo son sintetizadas en las plantas y algunos microorganismos, pero no en mamíferos, por lo que este mecanismo de acción no les afecta (Mesnage *et. al.*, 2015). Los estudios epidemiológicos revisados no demuestran correlación entre exposición al glifosato e incidencia de cáncer. Por otro lado, en el año 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado a este herbicida dentro del grupo 2A, siendo éste categorizado como posiblemente carcinogénico para humanos (OMS, 2016), acentuando el debate sobre su incidencia y consecuencias.

Los efectos del glifosato en organismos terrestres, permiten concluir que la toxicidad del herbicida varía según se encuentre como formulado o como principio activo, de la especie evaluada y del estado de desarrollo de los organismos. De manera general, se puede concluir que la toxicidad es leve o moderada. La escasa información

existente sobre concentraciones en ambientes acuáticos y terrestres, representativos de zonas productivas de nuestro país, en las cuales se realiza un uso rutinario del herbicida, no permite realizar una evaluación certera de riesgo para la biota asociable al uso extensivo del glifosato. Además, la información existente alerta sobre la necesidad de contar con más pruebas respecto a los efectos a largo plazo y de exposición a aplicaciones reiteradas sobre las poblaciones, a las interacciones entre organismos y a la consecuente pérdida de hábitats en agroecosistemas (CONICET, 2009).

En este contexto, resultaría útil tener herramientas que permitan detoxificar la molécula de glifosato de los ambientes naturales a través de la biorremediación. Es por ello que en este trabajo se propone aislar y estudiar bacterias autóctonas capaces de utilizar al glifosato como sustrato para su crecimiento y de esta forma disminuir o eliminar su presencia de las fuentes naturales en las que se encuentra.

Objetivos

- Aislar bacterias capaces de degradar glifosato a partir de suelos de la provincia de Santa Fe con historia de fumigaciones repetidas
- Identificar molecularmente los aislados bacterianos de interés.

- Caracterizar la actividad de estos aislamientos en la degradación del glifosato.

Materiales y Métodos

Aislamiento de las bacterias de interés

El material de partida utilizado proviene de la zona rural cercana a la localidad de Chañar Ladeado, Santa Fe, Argentina. Particularmente se utilizaron muestras de suelos (-33,3628 Latitud y -62,0553 Longitud), rizósfera de maíz (-33,3222 de Latitud, -62,0041 de Longitud), tierra, rizósfera de la maleza *Carduus acanthoides* L., nódulos de soja y rastrojo (-33,3182 de Latitud, -62,0279 de Longitud). Todas las muestras se recolectaron de lugares fumigados reiteradamente con el herbicida glifosato durante 15-20 años, y por último, muestras de suelo regadas periódicamente en el laboratorio con agua suplementada con glifosato.

De cada muestra (suelo, rizósfera o nódulos) se tomaron aproximadamente 0,8-1 g de tierra, 1 g de raíces cortadas en segmentos de 1 cm y 5 o 6 nódulos de plantas de soja joven de aproximadamente 1 mes, respectivamente. Las mismas fueron agregadas a frascos estériles con el medio mínimo MSM suplementado con glifosato como única fuente de carbono; o MSI suplementado con este herbicida como única fuente de fósforo. Los cultivos se incubaron en un agitador rotatorio a 180 rpm durante 5 días a temperatura controlada de 28°C y posteriormente se

realizaron subcultivos de enriquecimiento durante dos a tres semanas inoculando un 1mL de cultivo en medio fresco suplementado con concentraciones gradualmente mayores de glifosato hasta alcanzar la concentración máxima. A continuación, se tomaron 100 µl de cada cultivo y se plaquearon en medio MSM o MSI agar suplementado con glifosato. Finalmente se hicieron sucesivos repiques hasta conseguir colonias aisladas que fueron tomadas individualmente para obtener cultivos puros. Las bacterias fueron almacenadas con glicerol a -70°C.

Identificación de bacterias

Las cepas aisladas fueron identificadas por medio de Espectrometría de Masas y/o por secuenciación de sus ARNr 16S. En el primer caso, se utilizó el modelo Bruker Daltonik MALDI Biotyper del Centro de Especialidades Médicas Ambulatorias de Rosario (CEMAR). El espectro de proteínas ribosomales de cada bacteria fue comparado con la base de datos del software Bruker y aquellas con índices mayores o iguales 2.2, fueron identificadas en términos de género y especie.

En el caso de la secuenciación del ARNr 16S, se realizó una PCR colonia utilizando los oligonucleótidos universales fD1 y rP1 (Caporaso *et. al.*, 2011). Los amplicones de 1500pb obtenidos se secuenciaron y las secuencias resultantes se analizaron mediante la comparación con bases de datos específicas: Ribosomal Database Project (RDP) y GenBank.

Análisis de la resistencia a Antibióticos

Para evaluar la resistencia a antibióticos (ATB), se crecieron las bacterias a saturación y se realizaron diluciones seriadas de las mismas que se sembraron sobre placas de LB-agar suplementada con los antibióticos: Ampicilina (Amp) 100µg/mL, Gentamicina (Gm) 20µg/mL, Kanamicina (Kan) 40µg/mL, Espectomicina (Sp) 25µg/mL, Cloranfenicol (Cln) 25µg/ml y Estreptomicina (Stp) 100 µg/ml. Se observó el crecimiento bacteriano de las distintas diluciones para concluir si las bacterias eran resistentes al ATB presente en la placa.

Resultados y Discusión

Los aislamientos se realizaron en tres etapas, en las cuales se trabajó con distintas concentraciones iniciales de glifosato y diversos materiales de partida, siendo todos ellos provenientes de lugares con historia de repetidas aplicaciones de glifosato.

Primer aislamiento

En la primera etapa se trabajó con muestras de suelo, rastrojo, rizósfera de maíz y nódulos de soja provenientes de terrenos sometidos a numerosas fumigaciones con el herbicida. Estas

muestras fueron inoculadas en tres medios líquidos diferentes: MSM, MSI y LB, todos ellos suplementados con 3g/L de glifosato. Posteriormente, estos cultivos se mantuvieron en agitación a 180 rpm y a temperatura constante de 28°C durante 4 días y luego se realizaron 2 subcultivos consecutivos. En el tercer subcultivo se aumentó la concentración a 6g/L de glifosato y posteriormente a 12g/L de GP. Como paso final, se tomaron 100 µl de estos cultivos y se sembraron en placas MSI, MSM o LB Agar 2% suplementados con 3g/L de glifosato, las cuales se incubaron a 28°C entre 5 a 7 días. Todas las bacterias morfológicamente distintas fueron repicadas por separado hasta obtener colonias aisladas.

Las cepas obtenidas en el primer aislamiento se muestran en la tabla I. En ella se detallan: el nombre adoptado para cada cepa, el material de partida, el medio de cultivo donde se realizó el aislamiento, el rango de concentración de glifosato que se utilizó para su selección en medio líquido, el método de identificación utilizado y la especie identificada.

# Cepa	Material de Partida	Medio de aislamiento	Rango de cc. de GP	Método de identificación	Especie	Nomenclatura
1A	Nódulos de soja	MS1+ GP	3-12g/L	Secuenciación y Espectrometría de masas	<i>Pantoea agglomerans</i>	Pag0
1B	Rizósfera de maíz	MS1+ GP	3-12g/L	Secuenciación y Espectrometría de masas	<i>Pantoea agglomerans</i>	Pag1
1C	Rastrojo	MS1+ GP	3-12g/L	Secuenciación	<i>Pantoea sp.</i>	CAM4
1D	Suelo	MS1+ GP	3-12g/L	Secuenciación y Espectrometría de masas	<i>Pantoea ananatis</i>	Pan0
1E	Rastrojo	MS1 + GP	3-12g/L	Secuenciación y Espectrometría de masas	<i>Pantoea ananatis</i>	Pan1
1F	Suelo	MS1 +GP	3-12g/L	Secuenciación y Espectrometría de masas	<i>Ochrobactrum gallinifaecis</i>	Ogal
1G	Suelo	MSI +GP	3-12g/L	Secuenciación	<i>Erwinia sp.</i>	CAS6

Tabla I: cepas aisladas en la primera etapa de aislamiento

Segundo aislamiento

En la segunda etapa de clasificación se utilizaron muestras provenientes de suelo, de rizósfera de soja y tierra regada 2 veces durante 3 semanas con glifosato. Estas muestras fueron inoculadas en frascos estériles con medio MSI o MSM suplementado con 1,5 g/L de glifosato. Todos los cultivos fueron tratados de igual forma que durante la primera etapa.

Posteriormente, en el tercer subcultivo se aumentó la concentración a 2–g/L de glifosato y luego a 3–g/L y 6–g/L de glifosato en forma consecutiva, luego se plaquearon- sembraron en MS1 Agar como se mencionó para el primer aislamiento y se realizaron repiques hasta obtener colonias puras.

# Cepa	Material de Partida	Medio de aislamiento	Rango de cc. de GP	Método de identificación	Especie	Nomenclatura
2A	Suelo	MS1+ GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Ochrobactrum Anthropi</i>	Oan
2B	Suelo	MS1+ GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Achromobacter Xylosoxidans</i>	Axy
2C	Suelo	MS1+ GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Debaryomyces Hansenii</i>	Dhan
2D	Suelo	MS1+ GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Achromobacter Denitrificans</i>	Aden0
2E	Suelo	MS1 + GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Achromobacter Denitrificans</i>	Aden1
2F	Rizósfera de soja	MS1 +GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Achromobacter Insolitus</i>	Ain0
2G	Rizósfera de soja	MSI +GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Achromobacter Insolitus</i>	Ain1
2H	Suelo regado con GP	MS1+ GP	1-6 g/L	Secuenciamiento 16S	<i>Ochrobactrum Haematophilum</i>	Oha0
2J	Rizósfera de soja	MS1+ GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Candida</i>	Cru0

					<i>Rugose</i>	
2K	Suelo	MS1+ GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Candida</i> <i>Rugose</i>	Cru1
2L	Suelo	MS1+ GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Achromobacter</i> <i>Denitrificans</i>	Aden2
2M	Rizósfera de soja	MS1 + GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Achromobacter</i> <i>Insolitus</i>	Ain2
2N SRC	Suelo regado con GP	MSM +GP	1-6 g/L	Secuenciamiento 16S	<i>Ochrobactrum</i> <i>haematophilum</i>	Oha1

Tabla II: cepas aisladas en la segunda etapa de aislamiento

# Cepa	Material de Partida	Medio de aislamiento	Rango de cc. de GP	Método de identificación	Especie	Nomenclatura
2A	Suelo	MS1+ GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Ochrobactrum</i> <i>Anthropi</i>	Oan
2B	Suelo	MS1+ GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Achromobacter</i> <i>Xylooxidans</i>	Axy
2C	Suelo	MS1+ GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Debaryomyces</i> <i>Hansenii</i>	Dhan
2D	Suelo	MS1+ GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Achromobacter</i> <i>Denitrificans</i>	Aden0
2E	Suelo	MS1 + GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Achromobacter</i> <i>Denitrificans</i>	Aden1
2F	Rizósfera de soja	MS1 +GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Achromobacter</i> <i>Insolitus</i>	Ain0
2G	Rizósfera de soja	MSI +GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Achromobacter</i> <i>Insolitus</i>	Ain1
2H	Suelo regado con GP	MS1+ GP	1-6 g/L	Secuenciamiento 16S	<i>Ochrobactrum</i> <i>Haematophilum</i>	Oha0
2J	Rizósfera de soja	MS1+ GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Candida</i> <i>Rugose</i>	Cru0
2K	Suelo	MS1+ GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Candida</i> <i>Rugose</i>	Cru1
2L	Suelo	MS1+ GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Achromobacter</i> <i>Denitrificans</i>	Aden2
2M	Rizósfera de soja	MS1 + GP	1-6 g/L	Espectrometría de masas	<i>Achromobacter</i> <i>Insolitus</i>	Ain2
2N SRC	Suelo regado con GP	MSM +GP	1-6 g/L	Secuenciamiento 16S	<i>Ochrobactrum</i> <i>haematophilum</i>	Oha1

Tabla II: cepas aisladas en la segunda etapa de aislamiento

En esta etapa de aislamiento se encontraron no sólo especies bacterianas, sino también levaduras,

como *Debaryomyces hansenii* y el hongo *Candida rugosa*, y se propuso sólo En esta etapa de aislamiento se encontraron no sólo especies bacterianas, sino también levaduras,



como *Debaryomyces hansenii* y el hongo *Candida rugosa*, y se propuso sólo continuar trabajando con las cepas bacterianas. Por lo tanto, estas cepas fueron eliminadas del análisis.

Tercer aislamiento

En la tercer etapa de aislamiento se utilizaron muestras de rastrojo, tierra (suelo1) y de la maleza *Carduus acanthoides* L (CR), obtenidas del terreno ubicado a -33,3182 de latitud, -62,0279 de longitud, donde se realizaron varias aplicaciones con glifosato, siendo la última 15 días antes de la recolección de la muestra. También se utilizaron muestras de suelo terreno localizado a -33,3222 de latitud, -62,0041 de longitud, el cual tiene historia de repeticiones de fumigaciones anuales con el herbicida y cuya última aplicación se realizó 2 meses anteriores a la recolección.

Todas las muestras fueron inoculadas en frascos estériles con 10mL de medio MSI

Tercer aislamiento

En la tercer etapa de aislamiento se utilizaron muestras de rastrojo, tierra (suelo1) y de la maleza *Carduus acanthoides* L (CR), obtenidas del terreno ubicado a -33,3182 de latitud, -62,0279 de longitud, donde se realizaron varias aplicaciones con glifosato, siendo la última 15 días antes de la recolección de la muestra. También se utilizaron muestras de suelo terreno localizado a -33,3222 de latitud, -62,0041 de longitud, el cual tiene historia de repeticiones de fumigaciones

o MSM suplementadas con 0,01 g/L de glifosato. Estos cultivos fueron crecidos en agitación a 180 rpm y a temperatura constante de 28°C durante 4 días y luego se realizaron 2 subcultivos consecutivos manteniendo la concentración de glifosato. En el tercer subcultivo se aumentó la concentración a 0,05g/L de glifosato y luego a 1 g/L. Posteriormente, se tomaron 100 µl de estos cultivos, por un lado y las bacterias adheridas en forma de biofilm a la pared de los frascos, por el otro. Todas las muestras se plaquearon en placas MSI o MSM Agar 2% suplementados inicialmente con 0,05g/L de glifosato y se crecieron a 28°C durante 5 a 7 días. En total se realizaron 9 repiques hasta obtener colonias aisladas y la concentración de glifosato final fue de 1 g/L.

En el tercer aislamiento se obtuvo un total de 52 cepas aisladas, y las mismas se muestran a continuación en la tabla III:

anuales con el herbicida y cuya última aplicación se realizó 2 meses anteriores a la recolección.

Todas las muestras fueron inoculadas en frascos estériles con 10mL de medio MSI o MSM suplementadas con 0,01 g/L de glifosato. Estos cultivos fueron crecidos en agitación a 180 rpm y a temperatura constante de 28°C durante 4 días y luego se realizaron 2 subcultivos consecutivos manteniendo la concentración de glifosato. En el tercer subcultivo se aumentó la concentración a 0,05g/L de

glifosato y luego a 1 g/L. Posteriormente, se tomaron 100 µl de estos cultivos, por un lado y las bacterias adheridas en forma de biofilm a la pared de los frascos, por el otro. Todas las muestras se plaquearon en placas MSI o MSM Agar 2% suplementados inicialmente con 0,05g/L de glifosato y se crecieron a 28°C durante 5 a 7 días. En total se realizaron 9

repiques hasta obtener colonias aisladas y la concentración de glifosato final fue de 1 g/L.

En el tercer aislamiento se obtuvo un total de 52 cepas aisladas, y las mismas se muestran a continuación en la tabla III:



Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO



# Cepa	Material de Partida	Medio de aislamiento	Rango de cc. de GP	Método de Identificación	Especie	Nomenclatura
C1	<i>Carduus acanthoides</i> (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter Guillouiae</i>	Agui0
C2	<i>Carduus acanthoides</i> (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter Guillouiae</i>	
C3	<i>Carduus acanthoides</i> (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Rhizobium Radiobacter</i>	
C4	<i>Carduus acanthoides</i> (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter Guillouiae</i>	
C5	<i>Carduus acanthoides</i> (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Ochrobactrum Intermedium</i>	Oin0
C6	<i>Carduus acanthoides</i> (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter Guillouiae</i>	
C7	<i>Carduus acanthoides</i> (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter Guillouiae</i>	
C8	<i>Carduus acanthoides</i> (cultivo líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Rhizobium Radiobacter</i>	Rrad0
C9	<i>Carduus acanthoides</i> (cultivo líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Rhizobium Radiobacter</i>	
C10	<i>Carduus acanthoides</i> (cultivo líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	
C11	<i>Carduus acanthoides</i> (cultivo líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Rhizobium radiobacter</i>	
C12	<i>Carduus acanthoides</i> (cultivo líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	
C13	<i>Carduus acanthoides</i> (cultivo líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	
C14	<i>Carduus acanthoides</i> (cultivo líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	
C15	<i>Carduus acanthoides</i> (cultivo líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Rhizobium radiobacter</i>	
C16	<i>Carduus acanthoides</i> (cultivo líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	
C17	<i>Carduus acanthoides</i> (cultivo líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Rhizobium radiobacter</i>	
C18	<i>Carduus acanthoides</i> (cultivo líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	
C19	Suelo1- (cultivo líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Rhizobium radiobacter</i>	
C20	Suelo1- (cultivo líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	
C21	Suelo1- (cultivo líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	
C22	Suelo1- (cultivo líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Delftia acidovorans</i>	Dac0
C23	Suelo1- (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	No identificado	

C24	Suelo1- (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Rhizobium radiobacter</i>	Rrad1
C25	Suelo1- (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Delftia acidovorans</i>	Dac1
C26	Suelo1- (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	Agui1
C27	Suelo1- (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Delftia acidovorans</i>	
C28	Suelo1- (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Delftia acidovorans</i>	
C29	Suelo1- (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Rhizobium radiobacter</i>	
C30	Suelo1- (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	
C31	Suelo1- (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Rhizobium radiobacter</i>	
C32	Suelo1- (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	
C33	Suelo- (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	
C34	Suelo1- (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	
C35	Suelo1- (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	Oin1
C36	Suelo1- (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Rhizobium radiobacter</i>	
C37	Suelo2- (biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Rhizobium radiobacter</i>	
C38	Suelo2- (biofilm)	MSM + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	Pnit
C39	Suelo2- (líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	
C40	Suelo2- (líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Pseudomonas putida</i>	Pput0
C41	Suelo2- (líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	
C42	Suelo2- (líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	
C43	Suelo2- (líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Pseudomonas putida</i>	Pput1
C44	Suelo2- (líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	Agui2
C45	Suelo2- (líquido)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	
C46	Rastrojo-(biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	
C47	Rastrojo-(biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	No identificada	
C48	Rastrojo-(biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de	<i>Acinetobacter</i>	



				masas	<i>Guillouiae</i>	
C49	Rastrojo-(biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Rhizobium</i> <i>Radiobacter</i>	Rrad2
C50	Rastrojo-(biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter</i> <i>guillouiae</i>	
C51	Rastrojo-(biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter</i> <i>guillouiae</i>	
C52	Rastrojo-(biofilm)	MSI + GP	0,01-1g/L	Espectrometría de masas	<i>Acinetobacter</i> <i>guillouiae</i>	

Tabla III: cepas aisladas en la tercer etapa de aislamiento.

En esta etapa, se obtuvieron 52 cepas, (más de dos veces de las que se obtuvieron en las otras dos etapas de aislamiento). Esto puede deberse a que se utilizaron concentraciones de glifosato menores que en las anteriores, ya sea tanto para los medios de enriquecimiento, como en el proceso de aislamiento. Sin embargo, cabe destacar que, a pesar de la cantidad, no se encontraron gran variabilidad entre las especies, incluso cuando se utilizó la estrategia de aislar bacterias tanto del biofilm formado en los frascos como del seno de la solución. Cabe destacar además, que en las tres etapas de aislamiento, la mayoría de las bacterias aisladas provienen del medio MS1, en el cual utilizan al GP como fuente de fósforo por lo cual, este compuesto sería una buena fuente de fósforo, pero no de carbono para las bacterias estudiadas. Las bacterias cuya nomenclatura se detalla (en la última columna de la tabla) fueron guardadas para seguir trabajando, mientras que las demás, por pertenecer a especies redundantemente encontradas, fueron eliminadas.

Caracterización del crecimiento de las cepas aisladas en medio con glifosato.

Las curvas de crecimiento se realizaron en medio MSI suplementado con 5g/L y 15 g/L de glifosato como fuente de fósforo y 90mM de KH_2PO_4 como control positivo de crecimiento. A partir de ellas se obtuvieron los parámetros: tiempo de fase lag (h) y velocidad de crecimiento (DO/h). Por lo general, se trabajó con una de las cepas correspondiente a cada una de las especies aisladas: *Achromobacter denitrificans* (Aden0), *Achromobacter insolitus* (Ain0), *Achromobacter xylosoxidans* (Axy), *Ochrobactrum gallinifaecis* (Ogal), *Ochrobactrum anthopi* (Oan0), *Ochrobactrum insolitus* (Oin0), *Ochrobactrum haematophilum* (Oha0), *Pantoea ananatis* (Pan0), *Pantoea agglomerans* (Pag0), *Acinetobacter guillouiae* (Agui0), *Pseudomonas putida* (Pput0), *Pseudomonas nitroreducens* (Pnit) y *Rhizobium radiobacter* (Rrad0).

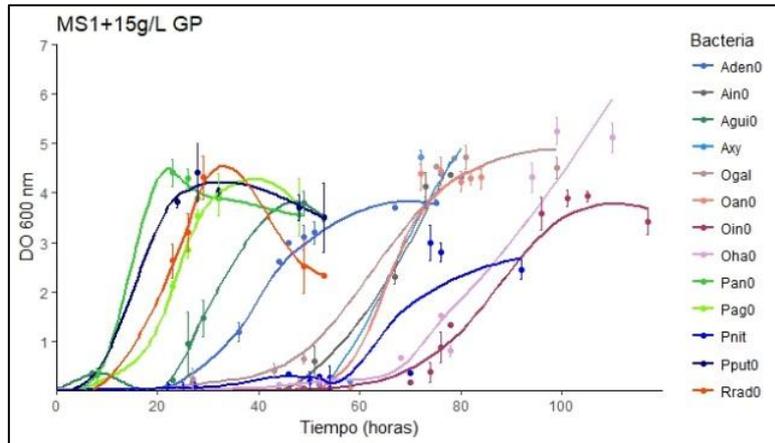
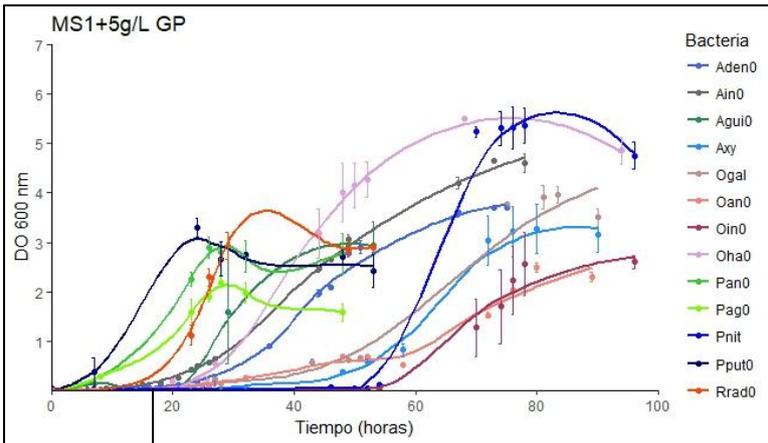
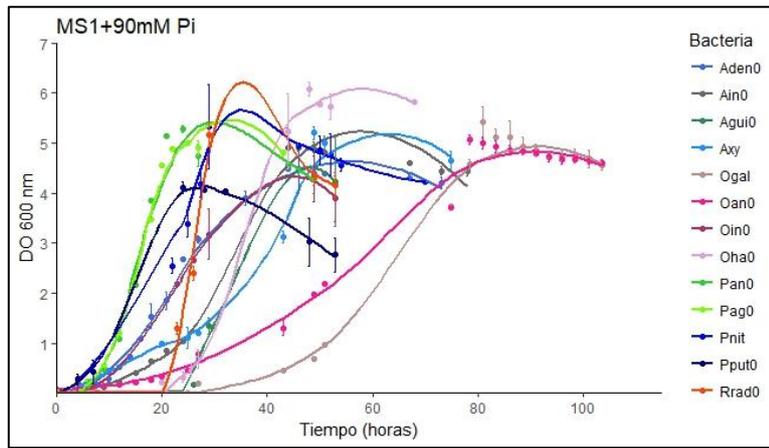


Figura 1. Curvas de crecimiento de los distintos aislamientos en MS1 + 90mM Pi y GP 5g/L y 15 g/L. Los ensayos fueron realizados tres veces y las barras corresponden al desvío estándar. Las curvas se ajustaron con el programa R Studio.

Bacteria	90mM Pi		5g/L GP		15g/L GP	
	μ (DO/h)	Fase lag (h)	μ (DO/h)	Fase lag (h)	μ (DO/h)	Fase lag (h)
Aden0	0,18	13,43	0,14	31,47	0,15	26,78
Ain0	0,19	21,63	0,09	19,34	0,15	48,25
Agui0	0,18	24,00	0,34	25,73	0,12	19,60
Axy	0,16	27,89	0,11	48,12	0,25	53,83
Ogal	0,14	48,49	0,11	49,56	0,14	47,46
Oan0	0,09	36,02	0,04	32,59	0,19	48,96
Oin0	0,13	6,30	0,16	62,64	0,13	72,60
Oha0	0,25	25,12	0,16	25,33	0,14	66,36
Pan0	0,46	11,08	0,14	8,19	0,28	8,00
Pag0	0,36	9,19	0,12	13,81	0,28	16,80
Pnit	0,38	18	0,12	53,19	0,25	53,68

Pput0	0,20	5,61	0,17	5,57	0,20	9,01
Rrad0	0,13	21,60	0,30	18,78	0,28	12,30

Tabla IV: Velocidades de crecimiento (μ)(DO/h), y Fase lag(h) obtenidas a partir de las curvas de crecimiento realizadas en las condiciones mencionadas anteriormente.

Como se puede observar en las figuras de las curvas de crecimiento y en la tabla IV, por lo general todas las bacterias crecen antes y más rápido en medio mínimo suplementado con fosfato. Con respecto al crecimiento en medio con glifosato, la bacteria que tiene menos tiempo en la fase lag, en cualquiera de las dos concentraciones, es *Pseudomonas putida* (Pput0). Luego, le siguen las bacterias del género *Pantoea*, Pag0 y Pan0, que tienen una velocidad de crecimiento similar en ambas concentraciones de GP, aunque es superiores mayor en el medio de mayor concentración. De lo contrario, las bacterias que tardan más en crecer son las del género *Ochrobactrum* (Oin0, Ogal, Oan0 y Ohan0) y por lo general se observa que a mayor concentración de GP, necesitan más tiempo de adaptación antes de comenzar su crecimiento. Por otro lado, del género *Achromobacter*, Axy es la bacteria que más tiempo en fase lag permanece, y aunque las demás (Ain0 y Aden0) tienen un comportamiento similar con respecto a las velocidades de crecimiento, la primera tiene un período de adaptación más largo. Con respecto a las bacterias *Acinetobacter guillouiae* (Agui0) y *Rhizobium Radiobacter* (Rrad0), se observa un comportamiento semejante

en las tres condiciones ensayadas. Por último la bacteria *Pseudomonas nitroreducens*, tiene un crecimiento más rápido en el medio control que en presencia de GP. Sin embargo, su velocidad aumenta conforme aumenta la concentración de GP.

Evaluación de la resistencia a antibióticos de las cepas aisladas

Cada una de las cepas aisladas en las 3 fases de aislamiento fue crecida en presencia de antibióticos tal como se describió en la sección de materiales y métodos. En las siguientes tablas se muestra cada cepa aislada y su correspondiente resistencia:

# Cepa	Nombre	Resistencia a ATB
1A	Pag0	Amp
1B	Pag1	Amp
1C	CAM4	Amp Cln
1D	Pan0	Amp, Gm
1E	Pan1	Amp, Gm
1F	Ogal	Amp, Gm, Kan, Sp
1G	CAS6	Amp, Gm, Sp, Tet, Sp, Cln

Tabla V. Resistencia a antibióticos de las cepas obtenidas en la etapa I

# Cepa	Nombre	Resistencia a ATB
2A	Oan	Amp, Kan, Sp, Cln
2B	Axy	Amp, Kan, Sp, Cln, Tet, Gm
2D	Aden0	Amp, Kan, Sp, Cln, Gm
2E	Aden1	Gm, Kan, Cln,
2F	Ain0	Amp, Gm, Kan, Sp
2G	Ain1	Amp, Kan, Sp, Cln, Tet, Gm
2H	Oha0	Kan, Sp, Cln,
2L	Aden2	Amp, Kan, Sp, Gm
2M	Ain2	Amp, Kan, Sp, Cln, Gm
2N	Oha1	Kan, Sp, Cln,

Tabla VI. Resistencia a antibióticos de las cepas obtenidas en la etapa II

# Cepa	Nombre	Resistencia a ATB
C1	Agui0	Amp, Sp, Kan, Gm, Cln
C5	Oin0	Amp, Sp, Kan, Cln, Stp
C8	Rrad0	Kan, Gm, Stp
C24	Rrad1	Kan, Stp, Cln, Sp
C26	Agui1	Kan, Cln, Sp
C35	Oin1	Amp, Sp, Kan, Cln, Stp
C38	Pnit	Tet, Amp, Cln
C40	Pput0	Amp, Sp, Cln, Stp
C43	Pput1	Cln, Sp
C44	Agui2	Kan, Cln, Sp

Tabla VII. Resistencia a antibióticos de las cepas obtenidas en la etapa III.

Como conclusión de este experimento, se puede observar que todas las especies analizadas poseen, al menos, 1 o 2 resistencias a antibióticos. Esto es consistente con el hecho de que al tratarse de bacterias ambientales, sobre todo obtenidas de la microbiota del suelo, es probable que tengan mecanismos de resistencia para protegerse de condiciones adversas como la producción de antibióticos por parte de otras bacterias de la comunidad. Si bien muchas de las bacterias aisladas seleccionadas fueron de la misma especie, presentaron resistencias a antibióticos diferentes y por lo tanto podrían tener otras características diferenciales. Tal es el caso de las especies de *Rhizobium radiobacter* (Rrad0 y Rrad1) o de *Acinetobacter guillouiae* (Agui0 y Agui1), mientras que por otro lado Agui1 y Agui2 se comportaron de igual manera. Lo mismo ocurrió con las cepas correspondientes a la especie *Pseudomonas putida* (Pput0 y Pput1), *Achromobacter denitrificans* (Aden0, Aden1 y Aden2), y para

Achromobacter insolitus (Ain0 y Ain1). Por otro lado, esta observación no es evidente para las cepas correspondientes a las especies de *Pantoea annanatis* (Pan0 y Pan1), *Pantoea agglomerans* (Pag0 y Pag1) o *Ochrobactrum haematophilum* (Oha0 y Oha1). Por tal motivo estas cepas podrían ser, en realidad la misma cepa y en tal caso deberíamos seguir estudiando otros parámetros fisiológicos y/o genéticos que nos permitan hacer esta inferencia.

Por último, resulta necesario remarcar la importancia de este experimento, ya que por lo general se utilizan los antibióticos como herramientas para la transformación u otras técnicas de biología molecular.

Conclusiones

En este trabajo se aislaron e identificaron por primera vez, bacterias capaces de crecer en medio mínimo suplementado con glifosato como única fuente de carbono o fósforo, a partir de campos con historia de fumigaciones con glifosato provenientes de la provincia de Santa Fe. Particularmente se aislaron 72 bacterias en tres etapas de aislamiento diferentes, mayoritariamente partir del medio MSI, en el cual utilizan al glifosato como fuente de fósforo. Algunas de las bacterias pertenecen a géneros que ya habían sido informados en la bibliografía como degradadoras de glifosato, como las del

género *Ochrobactrum* o *Achromobacter*, pero otras como las del género *Pantoea*, no habían sido reportadas hasta la actualidad.

Además, se estudió la capacidad de las cepas seleccionadas de crecer en distintas concentraciones de glifosato y, aunque todas pudieron hacerlo, algunas lo hicieron más eficientemente que otras.

Este trabajo contribuirá al estudio de la degradación del glifosato por parte de la microbiota autóctona del suelo contaminado con glifosato y al posible uso de estos microorganismos en procesos de biorremediación ambiental.

Bibliografía

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 4516-4522

COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN SOBRE CONSEJO CIENTÍFICO INTERDISCIPLINARIO Creado en el ámbito del CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET). (2009). EVALUACIÓN DE LA INFORMACIÓN CIENTÍFICA VINCULADA AL GLIFOSATO EN SU INCIDENCIA SOBRE LA SALUD HUMANA Y EL AMBIENTE. 1-133.

Duke, S. O., Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci* 69, 319–325.

Fan, J., Yang G., Zhao, H., Shi G., Geng Y., Hou, T., Tao K. (2012) Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58, 263–271.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2016). World Health Organization. Agents Classified by the IARC Monographs—, Volumes 1 – 119. 1-36

Jeffery, L. S., English, J. R., Connel, J. (1981). The Effects of Fall Application of Glyphosate on Corn (*Zea mays*), Soybeans (*Glycine max*), and Johnsongrass (*Sorghum halepense*). *Weed Sci.* 29, 190–195.

Kryuchkova YV., Burygin GL., Gogoleva NE, Gogolev YV, Chernyshova MP, Makarov OE, Fedorov EE, Turkovskaya OV. (2014) Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7 &. *Microbiol. Res.* 169, 99–105

Mesnage, R., Defarge N., Spiroux de Vendomois J., Séralini, G. E. (2015) Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem. Toxicol. J.* 84, 133-153.

Pollegioni, L. S., Siehl, D. E. (2011). Molecular basis of glyphosate resistance – different approaches through protein engineering. *FEBS J.* 278, 2753–2766.

Sviridov, A. V, Shushkova, T. V, Zelenkova, N. F., Leontievsky, A. A. (2012) Distribution of glyphosate and

methyolphosphonate catabolism systems in soil bacteria *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 93, 787–796.

Trigo, E. (2016). Biotecnología agrícola : los cultivos transgénicos o genéticamente modificados alcanzaron las 185, 1 millón de hectáreas en 2016 a nivel global. *Argenbio*.

Zhao H, Tao K, Zhu J, Liu S, Gao H, Zhou X. (2015). Bioremediation potential of glyphosate-degrading *Pseudomonas* spp. strains. *J Gen Appl Microbiol*.170, 165–170.