

REVISTA ELECTRÓNICA MENSUAL

Debates

sobre **innovación**

ISSN: 2594-0937

Abril-Junio 2024

VOL.8 NÚM. 2

Memorias LALICS 2023
Academia de Maestría - Seminario LALICS
Paraguay, PY.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Xochimilco



MEGI
MAESTRÍA EN ECONOMÍA, GESTIÓN
Y POLÍTICAS DE INNOVACIÓN



LALICS

LATIN AMERICAN NETWORK FOR ECONOMICS OF LEARNING,
INNOVATION AND COMPETENCE BUILDING SYSTEMS

DEBATES SOBRE INNOVACIÓN. Volumen 8, Número 2, mayo-junio 2024, es una publicación trimestral de la Universidad Autónoma Metropolitana a través de la Unidad Xochimilco, División de Ciencias Sociales y Humanidades, Departamento de Producción Económica. Prolongación Canal de Miramontes 3855, Col. Ex-Hacienda San Juan de Dios, Alcaldía Tlalpan, C.P. 14387, Ciudad de México y Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán, C.P. 04960, Ciudad de México. Teléfono 55 54837200, ext.7279. Página electrónica de la revista <https://revistadebates.xoc.uam.mx/index.php/debinnovacion/issue/view/17> y dirección electrónica: noticiaslatics@gmail.com Editor responsable: Dra. Gabriela Dutrénit Bielous. Certificado de Reserva de Derechos al Uso Exclusivo de **Título No. 04-2022-101113015800-102. ISSN 2594-0937**, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número: Mtra. Gloria Magdalena González Trejo, Departamento de Producción Económica, División de Ciencias Sociales y Humanidades, Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán, C.P. 04960, Ciudad de México. Fecha de última modificación: 01 de julio de 2024 Tamaño del archivo: 3.5 MB

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación. Queda estrictamente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización de la Universidad Autónoma Metropolitana.

**BIODEGRADACIÓN DE GLIFOSATO POR BACTERIAS
ESCHERICHIA COLI Y *PSEUDOMONAS* AISLADAS DE ARROYOS
NATURALES DE LA CUENCA DEL RÍO PARANÁ**

¹Andrea Sosa Ayala, ¹Alexa Aramí Gimenez Cabral, ²Gabriela Sosa Benegas, ²Lourdes Imas Garay

¹Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción Campus Alto Paraná.
Facultad de Ciencias de la Salud FACSA. Grupo Medio Ambiente y Sociedad.
Herib Campos Cervera. Hernandarias, Paraguay.

²Laboratorio de Agua y Sedimentos, División de Embalse MARR.CE,
Superintendencia de Gestión Ambiental Itaipu Binacional. Supercarretera
Itaipu km 16.5. Estación de Acuicultura. Hernandarias, Paraguay.

Autor de correspondencia: andreasosaayala99@gmail.com

Resumen

La principal ruta de degradación de herbicidas es la bacteriana que disminuye o destruye diversos contaminantes empleando la actividad biológica para la transformación de compuestos xenobióticos en una fuente de energía o nutrientes. Para evaluar la tolerancia y biodegradación potencial de bacterias ambientales provenientes de zonas agrícola, urbana, protegida y una cepa de referencia clínica, las cepas fueron expuestas a altas concentraciones de glifosato presentando todas actividad positiva, determinándose las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de todas las bacterias testadas en la investigación. El análisis inicial indica que la cepa de *E. coli* ATCC 25922 presenta un valor de MIC más alto (40 mg/mL) en comparación a las cepas *E. coli* aisladas de los arroyos (20 mg/mL). Así también los resultados indican que la *Pseudomonas* presenta una MIC de 35 mg/mL, lo que coincide con la literatura como una de las bacterias más tolerantes y con capacidad biodegradadora de pesticidas. En un futuro análisis, el potencial de degradación se cuantificará mediante la técnica de inmunoensayo (ELISA). Los resultados preliminares evidencian que las bacterias son tolerantes a concentraciones superiores a los límites regulatorios de glifosato en agua y abren perspectivas para el estudio de la biodegradación como posible solución a la contaminación por pesticidas.

Palabras clave: *glifosato, concentración inhibitoria mínima, Escherichia coli, Pseudomonas, biodegradación.*

Abstract

Bacterial degradation, in addition to being the main route of herbicide degradation, offers the possibility of reducing or destroying many contaminants using biological activity for the transformation of xenobiotic compounds into a source of energy or nutrients. To evaluate the tolerance and potential biodegradation of environmental bacteria from agricultural, urban, protected areas and a clinical reference strain, the strains were exposed to high concentrations of glyphosate presenting all the positive activities, determining the minimum inhibitory concentrations of all the bacteria tested on the research. Initial analysis indicates that *E. coli* strain ATCC 25922 has a higher MIC value (40 mg/mL) compared to *E. coli* strains isolated from streams (20 mg/mL). The results also indicate that *Pseudomonas aeruginosa* has a MIC of 35 mg/mL, which coincides with the literature as one of the most tolerant bacteria with pesticide biodegrading capacity. In a future analysis, the degradation potential will be quantified using the immunoassay technique (ELISA). Preliminary results show that the bacteria are tolerant to concentrations above the regulatory limits of glyphosate in water and open perspectives for the study of biodegradation as a possible solution to pesticide contamination.

Keywords: *glyphosate, minimum inhibitory concentration, Escherichia coli, Pseudomonas, biodegradation.*

1. Introducción

Desde la introducción de los cultivos genéticamente modificados resistentes a herbicidas a base de glifosato en 1996 (1), su aplicación ha aumentado exponencialmente, siendo el pesticida más utilizado en el sector agrícola en los últimos años (2). La mayoría de los herbicidas a base de glifosato no están aprobados para su aplicación en ambientes acuáticos, sin embargo, con su uso generalizado hay múltiples rutas a través de la cual puede ocurrir la exposición de los organismos acuáticos (3,4). Esto abre campo para la investigación de estrategias para la remediación de cuerpos de agua contaminados con glifosato.

La degradación bacteriana, además de ser la principal ruta de degradación del glifosato, ofrece la posibilidad de disminuir o destruir diversos contaminantes empleando la actividad biológica, utilizando organismos vivos o sus componentes para la transformación de compuestos xenobióticos en una fuente de energía para su metabolismo (5).

El trabajo consistió de 2 partes, en la primera etapa de investigación se estudiaron bacterias acuáticas capaces de crecer en presencia de altas concentraciones de glifosato, se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de 2 cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) aisladas de los arroyos Acaray-mi (ACMI) y Entre Ríos (ER) provenientes de la cuenca del río Paraná, una cepa de *Escherichia coli* American Type Culture Collection (ATCC) 25922 y una cepa de *Pseudomonas sp.* aislada del arroyo Itabó (IT) ubicado en la reserva Natural de Itabó. En una segunda etapa se realizará la determinación cuantitativa de la biodegradación del glifosato por las bacterias que presenten mayor tolerancia al herbicida, el método que se empleará será mediante la técnica ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

Esta investigación se considera pertinente y necesaria para generar información que pueda ser de utilidad para un futuro estudio de estrategia de biorremediación de los cursos de aguas, además, se relaciona con uno de los Objetivos de Desarrollo Sostenible 6 (ODS) de la Agenda 2030 (6).

2. Objetivo general

- Analizar la capacidad degradadora de glifosato comercial por bacterias *Escherichia coli* y *Pseudomonas* ambientales.

3. Objetivos específicos

- Evaluar de forma cualitativa la tolerancia de bacterias *Escherichia coli* y *Pseudomonas* ambientales a diferentes concentraciones de glifosato comercial.
- Determinar la concentración inhibitoria mínima de las bacterias *Escherichia coli* y *Pseudomonas* tolerantes a diferentes concentraciones de glifosato comercial.
- Determinar cuantitativamente la biodegradación de glifosato por *Escherichia coli* y *Pseudomonas* tolerantes.

4. Materiales y Métodos

Fueron reactivadas cepas bacterianas obtenidas del banco de bacterias del laboratorio de agua y sedimentos de la Itaipu Binacional, preservadas inicialmente a -80 °C en glicerol 20%, se seleccionaron las bacterias de los arroyos denominados Acarymi, Entre Rios e Itabó provenientes de áreas urbana, agrícola y protegida respectivamente. Se utilizó la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 procedente de un aislado clínico recomendada para pruebas de susceptibilidad (7). Las cepas puras de *E. coli* se aislaron en agar cromogénico (Brilliance™ *E. coli*/coliform, CM0956, Oxoid, UK) y la *Pseudomonas* sp. en medio diferencial (Cetrimide Agar Base, European Pharmacopoeia, USP CAT: 1102.00, Condalab, ES).

La primera etapa de la investigación consistió en pruebas de tolerancia de las bacterias a altas concentraciones de glifosato comercial (sal monoamónica de glifosato 75,7 % p/p PLATOON WG), la técnica de difusión en agar brindó resultados cualitativos que fueron interpretados como sensibles o tolerantes. Los inóculos bacterianos se sembraron sobre la superficie de placas de agar Müller-Hinton. A continuación, se colocaron los oxford cups con 200 µl de cada concentración de glifosato, un control negativo de agua estéril y un control positivo del antibiótico fosfomicina. Luego, la placa se incubó a 37°C en la estufa de VF (Estufa de ventilación forzada WPL-45BE) por un periodo de 24 horas.

Las bacterias se cultivaron en medio nutritivo líquido R2A modificado sin fósforo, desarrollado por Reasoner y Geldreich en 1985, que imita las

condiciones de bajo contenido de nutrientes del agua de superficie, agua de pozo y aguas residuales.

Las cepas de *E.coli* fueron incubadas a 30°C por 72 horas. La *Pseudomonas sp.* se incubó a temperatura ambiente a 25°C por 72 horas.

La MIC del glifosato sobre los extractos bacterianos fue determinada utilizando la metodología de Suheil y Fehmey (2009) (8), adaptada a las condiciones de cultivo del estudio. Los inóculos bacterianos de la *E. coli* y *Pseudomonas* fueron ajustados a una OD 630 nm \cong 0.06, con el medio de cultivo líquido R2A. Los inóculos se añadieron a las placas multipocillos estériles de poliestireno de alta transparencia de 96 pocillos. En los pocillos de la columna número 1 a la 6 fueron colocadas alícuotas de 100 μ L del medio de cultivo R2A y 50 μ L de solución de glifosato 40 mg/mL en diluciones seriadas ($\frac{1}{2}$), se mezcló y se traspasó 50 μ L de la primera fila A a la fila B y así sucesivamente hasta la última fila H, desechando los 50 μ L sobrantes, conteniendo la fila A la concentración más alta y la fila H la más baja. El mismo procedimiento se realizó para la *Pseudomonas* con una solución inicial de 70 mg/mL. En paralelo, se añadió 100 μ L del medio R2A junto con 50 μ L del antibiótico fosfomicina y 50 μ L de inóculo de la bacteria ATCC, como control positivo del ensayo. Para el control negativo se añadió 150 μ L de medio R2A y 50 μ L de la solución de glifosato. Finalmente, se añadió 50 μ L de inóculo de *E. coli* agregados en los pocillos de la columna 1 a la 7 de la microplaca. La placa de micropocillos de *E. coli* fue incubada a 30 °C en oscuridad en Estufa FV WPL-45BE por 24 hs. La placa de *Pseudomonas* fue incubada a temperatura ambiente en oscuridad por 24 hs.

La concentración inhibitoria mínima fue determinada mediante mediciones de densidad óptica DO a 630 nm, al final del experimento se adiciona 40 μ L de solución acuosa 1% TTC (cloruro de trifeníl tetrazolio). La concentración inhibitoria mínima fue definida como la concentración más baja en la cual el extracto bacteriano obtuvo la menor densidad óptica y produjo inhibición visible del crecimiento de las bacterias dando una coloración roja. El TCC no se fija a células muertas. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado

y la distribución de los datos obtenidos fue testada utilizando la prueba de Shapiro Wilk y Paired Sample t-test en software PAST.

En la segunda etapa de la investigación se realizará la determinación cuantitativa de glifosato en la prueba de biodegradación mediante ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) de la marca ABRAXIS, un ensayo colorimétrico del tipo competitivo basado en una modificación de la inhibición de la enzima Acetilcolinesterasa (ACh-E). /ACh-Ehidroliza la acetiltocolina (ATC) que reacciona con 5,5'-Dithio-bis (2-Nitrobenzoico acido) [DTNB] para producir una coloración amarilla inversamente proporcional a la concentración.

5. Resultados y Discusión

Se determinó la tolerancia de las bacterias *E. coli* y *Pseudomonas* al glifosato, cepas aisladas de arroyos naturales provenientes de la cuenca del río Paraná de zonas; urbana, agrícola, protegida y además, una cepa clínica de referencia. Como resultado de las pruebas cualitativas en medio sólido, todas las cepas fueron caracterizadas con actividad positiva, es decir con halo de inhibición alrededor de los oxford cups.

La MIC del glifosato sobre los extractos bacterianos fue determinada utilizando la metodología de Suheil y Fehmey (2009) (8), adaptada a las condiciones de cultivo del estudio. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados del ensayo de Concentración Inhibitoria Mínima de las cepas bacterianas contra Glifosato comercial. *Resultados expresados como media de dos replicas medidas \pm SD. Donde SD: Desvío Estándar, ATCC: American Type Culture Collection.

Punto de muestreo	Zona	Bacteria	Rango MIC testado (mg/mL)	Inhibición de crecimiento MIC* \pm SD (mg/mL \pm SD)
Arroyo Acaray-mi	Urbana	<i>Escherichia coli</i>	40-0.31	20 \pm 0.007
Arroyo Entre Ríos	Agrícola	<i>Escherichia coli</i>	40-0.31	20 \pm 0.003
ATCC 25922	Aislado clínico	<i>Escherichia coli</i>	40-0.31	40 \pm 0.3
Arroyo Itabó	Reserva Forestal	<i>Pseudomonas</i> sp.	70-0.54	35 \pm 0.001

Fuente: elaboración propia.

Las bacterias provenientes de los arroyos ACMI y ER presentaron una MIC de 20 mg/mL. Se mostraron diferencias según el uso del suelo circundante, la bacteria ER de zona agrícola presentó una menor sensibilidad a glifosato de manera significativa ($t=2.9144$; $p= 0.054$). Sin embargo, la bacteria *Pseudomonas* aislada de la reserva protegida Itabó presentó una MIC de 35 mg/mL, siendo la cepa con un valor de MIC más elevado con respecto a las demás bacterias testadas, lo que coincide con los antecedentes como una de las bacterias más tolerantes y con capacidad biodegradadora de pesticidas (9).

La cepa de *E. coli* ATCC 25922 presentó un valor más alto en comparación a las cepas *E. coli* aisladas de los arroyos por lo tanto los resultados reflejan que las bacterias ambientales son menos tolerantes que la ATCC de muestra clínica en las condiciones del experimento.

6. Conclusiones

La evaluación de la tolerancia de las bacterias ambientales *Escherichia coli* y *Pseudomonas* a diferentes concentraciones de glifosato comercial ha revelado que todas las bacterias testadas presentan tolerancia a altas concentraciones del herbicida, con respecto al rango de valores testados de la MIC, todas las cepas presentaron un valor igual o superior a 20 mg/mL. Estos resultados iniciales evidencian que todas las bacterias son tolerantes a concentraciones superiores a los límites regulatorios de glifosato en agua (10).

Los resultados esperados en la segunda etapa de la investigación son que las bacterias tolerantes a altas concentraciones de glifosato sean capaces de degradarlo utilizando el herbicida como fuente de nutrientes para su metabolismo. La investigación complementaria sobre los mecanismos de degradación del glifosato por parte de las bacterias ambientales podría conducir al desarrollo de métodos más efectivos para eliminar el glifosato de aguas contaminadas.

7. Bibliografía

- Brookes G., Barfoot P. GM Crops: The global economic and environmental impact--the first nine years 1996-2004. 2005 [cited 2023 May 17]; Available from: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301031698>
- Grube A, Donaldson D, Kiely T, Wu L. Pesticide Industry Sales and Usage Report: 2006 and 2007 Market Estimates. 2006 [cited 2023 May 15]; Available from: https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/market_estimates2007.pdf
- Solomon KR, Thompson DG. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* [Internet]. 2003 May [cited 2023 May 15];6(3):289–324. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12746143/>
- Rueppel ML, Brightwell BB, Schaefer J, Marvel JT. Metabolism and degradation of glyphosphate in soil and water. *J Agric Food Chem* [Internet]. 1977 May 1 [cited 2023 May 15];25(3):517–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/858844/>
- Singh S, Kumar V, Gill JPK, Datta S, Singh S, Dhaka V, et al. Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2020 Oct 2 [cited 2023 May 15];17(20):1–18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7602795/>
- Objetivos y metas de desarrollo sostenible - Desarrollo Sostenible [Internet]. [cited 2023 May 15]. Available from: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
- Minogue TD, Daligault HA, Davenport KW, Bishop-Lilly KA, Broomall SM, Bruce DC, et al. Complete Genome Assembly of Escherichia coli ATCC 25922, a Serotype O6 Reference Strain. *Genome Announc* [Internet]. 2014 [cited 2023 May 17];2(5):969–83. Available from: </pmc/articles/PMC4175212/>
- Fehmey A., F.M.Suheil. Determination of minimum inhibitory concentration from chemical Pesticides on bacteria Azotobacter numbers with period of incubation diffrant . *Diyala Agric Sci J* [Internet]. 2009 [cited 2023 May 15];1(1). Available from: <https://www.iasj.net/iasj/article/33602>
- Ouided B, Abderrahmane B. Isolation and characterization of glyphosate-degrading bacteria from different soils of Algeria. *African J Microbiol Res* [Internet]. 2013 Dec 3 [cited 2023 Mar 18];7(49):5587–95. Available from: https://www.researchgate.net/publication/264805166_Isolation_and_characterization_of_glyphosate-degrading_bacteria_from_different_soils_of_Algeria
- SASAL M, WILSON M, SIONE S, BEGHETTO S, GABIOUD E, OSZUST J, et al. Monitoreo de glifosato en agua superficial en Entre Ríos. La investigación acción participativa como metodología de abordaje. *Rev Investig Agropecu* [Internet]. 2017 [cited 2023 May 15]; Available from: <https://redalyc.org/pdf/864/86452401016.pdf>