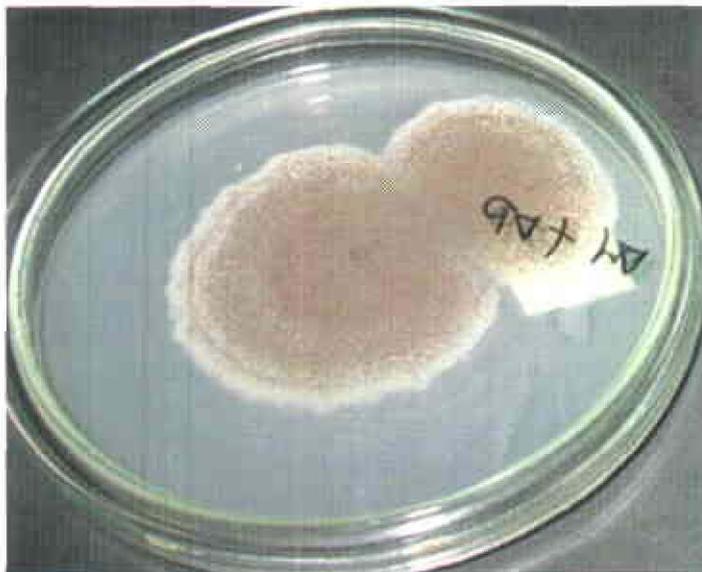


Ensayo exploratorio de microorganismos nativos útiles para la biodegradación de glifosato en cultivos de palma de aceite

Ingrid Viviana Clavijo López¹, Pedro Jesús Rocha Salavarieta²
Martha J. Vives Flores³



Introducción

Dentro de las labores de campo propias del cultivo de palma existen algunas que utilizan químicos complejos, por ejemplo, el control de malezas en los platos, la erradicación, el control de plagas, etc. Dichos tratamientos químicos pueden tener o no efectividad. Sin embargo, se desconoce el efecto que las moléculas empleadas están causando sobre el suelo, si están siendo degradadas rápidamente o si se están constituyendo en contaminantes.

Uno de los herbicidas utilizados de manera rutinaria es el glifosato, el cual puede ser empleado sólo o en mezclas con otras sustancias. Con respecto al empleo de este herbicida, existen opiniones divergentes, ya que varios estudios describen a este compuesto como un químico amigable con el ambiente, altamente biodegradable (Strange et al., 2004); la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2002) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA) afirman que tiene una toxicidad aguda oral baja en mamíferos ($DL_{50} \geq 5.000 \text{ mg/Kg}$), y no tiene propiedades cancerígenas, mutagénicas, ni tóxicas.

Sin embargo, otras investigaciones sugieren lo contrario. Algunos estudios realizados han reportado que los plaguicidas basados en glifosato tienen efectos ambientales (en suelos, agua y aire), ecológicos (en plantas y animales acuáticos y terrestres) y de salud en humanos (United States Department of Agriculture, 1997; Cox, 1995). Entre los principales hallazgos con respecto a los efectos colaterales del glifosato se ha encontrado que afecta la regulación del ciclo celular de peces y anfibios, igualmente se han reportado efectos genotóxicos, hormonales, enzimáticos, mutagénicos, cancerígenos, alteraciones genéticas e indicadores de estrés oxidativo (Bolognesi et al., 1997; Daruich et al., 2001; El-Demerdash et al., 2001).

Cenipalma, en su preocupación por los vacíos asociados al efecto de estas prácticas de manejo químico y como apoyo a las iniciativas del sector en cuanto a responsabilidad social e impacto ambiental, ha iniciado un ensayo preliminar en colaboración con el Centro de Investigaciones Microbiológicas (CIMIC) de la Universidad de los Andes. Este ensayo tiene como objetivo realizar una primera aproximación a la búsqueda de microorganismos nativos asociados al cultivo de palma de aceite con capacidad de biodegradar glifosato. Con el conocimiento generado se abre un campo nuevo en biorremediación que incluirá actividades tales como la identificación de microorganismos (bacterias y hongos) que (i) permitan la degradación de las moléculas empleadas como herbicidas para evitar así la contaminación del suelo y el agua y (ii) contribuyan al desarrollo sostenible de los cultivos, impulsando prácticas amigables con el ambiente.

Notas del Director de Biotecnología

Desde hace algunos años se ha clasificado la biotecnología por colores: roja, para la que trata de aspectos experimentales de humanos y animales; verde, para la agrícola y blanca, para aquella que trata sobre el medio ambiente. Por su aplicabilidad e importancia, una de las áreas de mayor interés en la biotecnología blanca es la bio-remediación, que se basa en la utilización de organismos vivos para descontaminar o reducir la carga contaminante que posee un ecosistema como resultado de actividades humanas industriales. Aspectos tales como la descontaminación de suelos o aguas contaminados con petróleo, metales pesados o químicos complejos (como los empleados en las agroindustrias) son temas de interés de esta área de la biotecnología. Por esta razón y en el marco de los compromisos de sostenibilidad ambiental del sector palmicultor colombiano, la División de Biotecnología de Cenipalma ha considerado pertinente desarrollar experimentos piloto en el tema. Para ello se han establecido alianzas estratégicas con diferentes instituciones, una de las cuales es el Centro de Investigaciones Microbiológicas (CIMIC) de la Universidad de los Andes. Así, los resultados presentados aquí, aunque preliminares y de estudio de caso se constituyen en una puerta de entrada a un área de importancia para el sector y de claro impacto ambiental, social y económico.

Pedro Jesús Rocha Salavarieta, Ph.D.
Director de la División de Biotecnología
Cenipalma

¹ Ingeniera Química, Microbióloga. Investigadora CIMIC, Universidad de los Andes, Bogotá.

² Biólogo, Ph.D., Investigador Titular, Director División de Biotecnología, Cenipalma.

³ Microbióloga, M.Sc., Profesora Investigadora, Centro de Investigaciones Microbiológicas - CIMIC, Universidad de los Andes, Bogotá.

Metodología

Muestras

Las muestras provinieron de una plantación de la Zona Occidental, la cual fue erradicada mediante método químico con glifosato y monocrotofos. Se tomaron tres muestras en total, las cuales incluyeron: muestras de suelo (MS1), muestras de tejido de palma (MP2) y muestras de detritos acumulados en las bases de las hojas (MT3). Aunque los ensayos se realizaron por duplicado para cada una de las muestras, el muestreo no fue sistemático y simplemente se basó en la observación de una palma erradicada. Así, los resultados presentados se constituyen en un estudio de caso.

Evaluación de la microbiota inicial del suelo

Se mezclaron 50 g de cada una de las muestras con 50 ml del medio mínimo salino (MMS) propuesto por Dworkin & Foster (1958). Se agitó durante una hora a 150 r.p.m. y se dejó reposar. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas a partir del sobrenadante y se hizo recuento en placa de unidades formadoras de colonia (UFC)/ml de hongos y bacterias.

Para bacterias se empleó el medio enriquecido Luria-Bertani (LB) compuesto por (g/L): triptona (10), extracto de levadura (5), NaCl (10) y agar bacteriológico (15). Para el aislamiento de hongos se utilizó el medio agar malta (g/L): extracto de malta (20), agar (17) y cloramfenicol (0,5). Las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas.

Selección y aislamiento de microorganismos

Se plantearon dos estrategias para la selección de microorganismos potencialmente degradadores, la estrategia de recuentos y la de aislamientos:

Estrategia de recuentos

Se basó en recuentos de bacterias y hongos tolerantes a diferentes concentraciones de glifosato, mientras crecían en cultivos mixtos. Este procedimiento se llevó a cabo, suplementando el MMS que contenía la muestra, con 100 mg/L de glifosato (Agrogen 480mg/L) y glucosa al 0,2%. Luego, el medio se incubó durante ocho días a 30°C. Al cabo de este tiempo, se tomó un volumen de 2,5 ml del cultivo crecido y se inoculó a 50 ml de MMS que contenía una mayor concentración de glifosato y se incubó en iguales condiciones. Lo anterior se realizó sucesivamente durante un período de mes y medio, empleando las siguientes concentraciones de glifosato: 100, 500, 1000, 1250, 1500 y 2000 mg/L. Para la recuperación de hongos presentes en las muestras, al medio propuesto se le agregó 0,5 ml de una solución de antibióticos (Ab) compuesta por (g/l): ampicilina (2,5) y cloranfenicol (2,5) (MMS+Ab). A medida que iba aumentando la concentración de glifosato, se realizaron recuentos de microorganismos, lo cual se llevó a cabo en placas de agar de MMS ó MMS + Ab (para bacterias y hongos respectivamente), adicionando al medio glifosato a una concentración igual a la que se encontraba en el medio líquido.

Estrategia de aislamientos

Se aislaron los morfotipos de microorganismos obtenidos en una concentración de 100 mg/L; una vez se obtuvieron cultivos puros tanto para hongos como para bacterias, se inocularon cada uno de los microorganismos individualmente en 10 ml de MMS con 500 mg/L de

glifosato. Estos cultivos se incubaron a 30°C y 150 r.p.m. durante ocho días. Al cabo de este tiempo se transfirió 10% del cultivo crecido a un medio fresco con una mayor concentración del herbicida, así se realizó sucesivamente con concentraciones de 1000, 1250, 1500 y 2000 mg/L de glifosato. En cada uno de los pases se determinó el crecimiento bacteriano por medio de recuentos en placa y medida de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm en el medio crecido. La evaluación de crecimiento fúngico se llevó a cabo de forma cualitativa denotando los parámetros de abundante crecimiento (+++), crecimiento moderado (++), escaso crecimiento (+) y crecimiento nulo (-).

Resultados

Los recuentos obtenidos tanto para hongos como para bacterias mostraron ser elevados (Tabla 1). Los recuentos obtenidos en cultivos mixtos, mostraron un comportamiento variable en el crecimiento bacteriano a medida que aumentó la concentración de glifosato (Figura 1). Este resultado demuestra que cuando las bacterias crecen en cultivos mixtos, son capaces de sobrevivir y posiblemente metabolizar el medio con glifosato. Sin embargo, los ensayos con cultivos individuales de diferentes morfotipos aislados, mostraron que únicamente cinco morfotipos (entre todas las muestras) sobrevivieron a una concentración de 500 mg/L y que ninguno de ellos fue capaz de tolerar una concentración mayor de glifosato (Figura 2). Lo anterior indica que posiblemente las bacterias pueden metabolizar el glifosato sólo cuando crecen en consorcio.

En contraste con el crecimiento bacteriano en cultivos mixtos, se observó un comportamiento diferente en hongos, ya que a pesar de los altos recuentos iniciales, se presentó una disminución de la población a medida que iba aumentando la concentración de glifosato (Figura 3).

En los ensayos de aislamientos individuales fúngicos se aislaron inicialmente 15 morfotipos los cuales fueron identificados hasta género por medio de morfología macro y microscópica. De estos 15 morfotipos, solo cinco (Tabla 2) lograron crecer en una concentración de 2000 mg/ml. Algunos de los morfotipos correspondieron a los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus* (Figura 4).

Análisis

Los resultados obtenidos en cultivos mixtos muestran una disminución en la población fúngica al tiempo que la población bacteriana aumenta. El que las bacterias compitan mejor por nutrientes con respecto a los hongos (Lindblom et al., 2005) justifica este comportamiento. Otro argumento que permite denotar lo anterior es el crecimiento óptimo de hongos en ausencia de bacterias, lo cual se observó en los aislamientos fúngicos. El alto recuento de hongos iniciales puede deberse a que estos microorganismos poseen variados mecanismos de reserva que les permiten sobrevivir un tiempo en ausencia de ciertos nutrientes, o en presencia de compuestos que no pueden degradar.

En los tratamientos individuales para los aislamientos bacterianos no se observó crecimiento a altas concentraciones de glifosato, a pesar que en la estrategia de recuentos la población bacteriana es alta a estas concentraciones. Este resultado posiblemente indica la presencia de un consorcio bacteriano potencialmente degradador del herbicida. Otra explicación a este comportamiento es que el crecimiento bacteriano esté ocurriendo a expensas de la presencia de hongos.

Consideraciones finales

Se han presentado los resultados parciales de un ensayo piloto que ciertamente demuestra la presencia de microorganismos en suelos y tejidos contaminados con glifosato y otros compuestos. En la siguiente fase de este ensayo se aislarán los morfotipos obtenidos en los recuentos en la mayor concentración de glifosato (2000 mg/L), con el fin de ser luego identificados molecularmente (mediante secuenciación de regiones ribosomales).

Hasta el momento, se han generado varios interrogantes. Así, valdría la pena explorar el potencial de esta microbiota para biodegradar glifosato

y eventualmente otras moléculas. Los resultados preliminares muestran un área de importancia a desarrollar y en la cual la interdisciplinariedad del Centro debe involucrarse. Será necesario cumplir con todos los requisitos de acceso a recurso biológico y genético para así explorar el verdadero potencial. Una vez hecho esto la investigación arrojará resultados aplicables en biorremediación de suelos, lo cual podría tener impacto positivo sobre la fauna, la flora, las fuentes de agua y los organismos asociados. De esta forma, se tendrían resultados que confirman el compromiso del sector palmicultor colombiano con el desarrollo sostenible basado en principios de responsabilidad social y ambiental.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los miembros del Comité Editorial de Cenipalma por la valiosa crítica de este manuscrito. La investigación de Cenipalma es financiada por Fedepalma - Fondo de Fomento Palmero (FFP).

Referencias

Balthazor, T., Hallas, L. 1986. Glyphosate-degrading microorganisms from Industrial activated sludge. Applied and environmental microbiology, 51: 432-434.

Bolognesi, C., Bonatti, S., & Degan, P. (1997). Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation roundup. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 45: 1957-1962.

Chakravarty, P., Chartapaul, L. 1990. Nontarget effect of herbicides: II. The influence of glyphosate on ectomycorrhizal symbiosis of red Pine under greenhouse and field conditions. Pesticide science, 28: 243-24.

Cox, C. 1995. Glyphosate, Part 1: Toxicology. Journal of pesticides reform, 15.

Cuervo, J.L. 2007. Comportamiento del glifosato en suelos arroceros del departamento del Tolima (Colombia) y su actividad sobre la biota microbial del suelo. Recuperado el 5 de Junio de 2008, de Universidad Nacional web site: <http://www.dib.unal.edu.co/launinvestiga/conferencias20070419.html>.

Daruich, J., Zirulnik, F., & Gimenez, M. (2001). Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. Environmental Research, 85: 226-231.

Lindblom, Cecilia Mille.; Fischer, Helmut.; Tranvik, Lars J. 2005. Antagonism between bacteria and fungi: substrate competition and a possible tradeoff between fungal growth and tolerance towards bacteria. Oikos 113 (2): 233-242.

Liu, C.M., Mclean, P., Sookdeo, C., Cannon, F. 1991. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family rhizobiaceae. Applied and environmental microbiology, 57, 1799-1804.

Schowaneck, D., Verstraete, W. 1990. Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples. Applied and environmental microbiology, 56: 895-903.

Shinabarger, D., Braymer, H. 1986. Glyphosate catabolism by pseudomonas sp. Strain PG2982. Journal of bacteriology, 168: 702-707.

World Health Organization (WHO). (2002). The who recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000-01.

Tabla 1. Recuento inicial en medios enriquecidos de microorganismos totales para cada una de las muestras.

Muestra	Recuento TOTAL bacterias (UFC/ml X 10 ³)	Recuento TOTAL Hongos (UFC/ml)
MS1	10,5±5,18	Incontable
MP2	15,5±0,2	Incontable
MT3	6,63±0,84	Incontable

Tabla 2. Género y crecimiento de los morfotipos fúngicos en glifosato a diferentes concentraciones.

MF	Género	Concentración (mg/ml)				
		500	1000	1250	1500	2000
1.1	<i>Fusarium sp.</i>	++	+	+	+	+
1.2		++	-			
1.3	<i>Aspergillus sp.</i>	+++	+	+	-	
1.4		+	++	+++	++	-
1.5	<i>Trichoderma sp.</i>	++	++	+	+	-
2.1		+	+++	+++	+++	+++
2.2		+++	++	-	-	
2.3	<i>Penicillium sp.</i>	++	+	+	+	+
2.5		+++				
3.1	<i>Penicillium sp.</i>	++	+	++	++	++
3.2	<i>Trichoderma sp.</i>	+++	+++	++	++	+
3.3	<i>Penicillium sp.</i>	++	+	+	++	++
3.4		++	-			
3.5	<i>Aspergillus sp.</i>	+	-			
3.6		++	++	-		

+ Poco crecimiento
 ++ Crecimiento
 +++ Buen crecimiento
 - Crecimiento nulo

Figura 1. Crecimiento bacteriano en cultivos mixtos a diferentes concentraciones de glifosato en todas muestras. MS1: Muestras de suelo, MP2: Muestras de tejido de palma, MT3: Muestras de detritos de hojas.

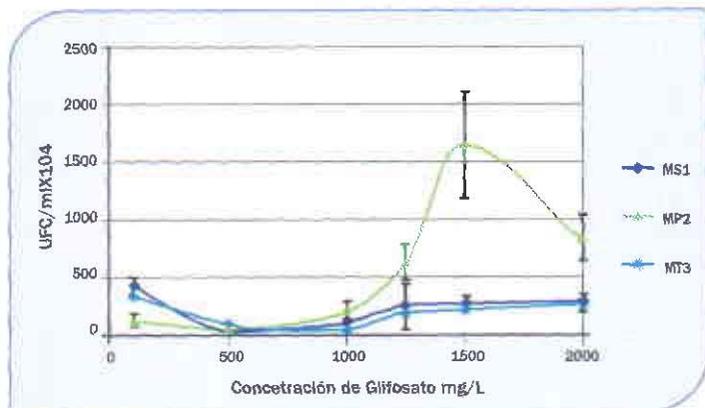


Figura 2. Número de morfotipos capaces de sobrevivir individualmente a diferentes concentraciones de glifosato.

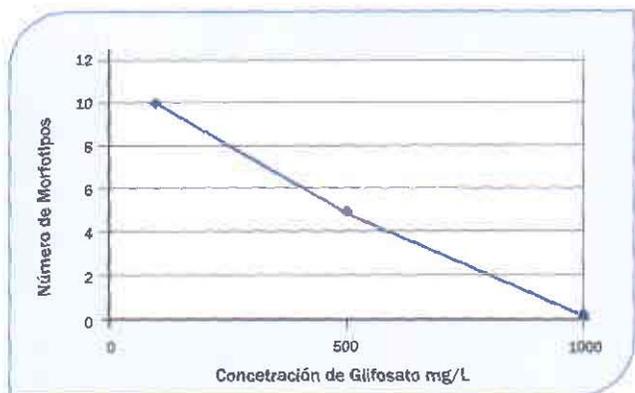
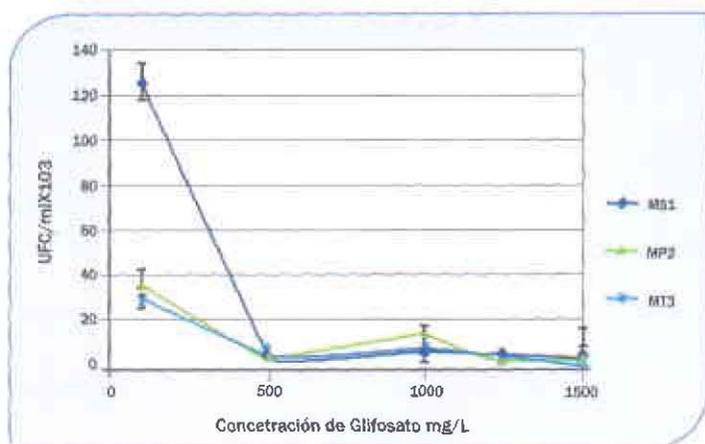


Figura 3. Crecimiento fúngico en cultivos mixtos a diferentes concentraciones de glifosato en todas muestras. MS1: Muestras de suelo, MP2: Muestras de tejido de palma, MT3: Muestras de detritos de hojas.



Fusarium ssp.



Aspergillus ssp.



Trichoderma ssp.



Figura 4. Morfología macro y microscópica de los hongos seleccionados.



Director: José Ignacio Sanz Scovino, Ph.D.
 Revisión de textos: Comité de Publicaciones de Cenipalma
 Coordinación editorial: Donaldo Donado - Jefe de Publicaciones
 Diseño y diagramación: Carlos Sandoval
 Impresión: Molher Ltda. Impresores
 Esta publicación contó con el apoyo de Fedepalma - Fondo de Fomento Palmero