

AISLAMIENTO DE BACTERIAS AUTÓCTONAS DE SUELOS DE CULTIVOS DE ARROZ CON APLICACIONES PERIÓDICAS DE AGROQUÍMICOS

Cuadra, Pablo N.¹; Fontana, Gimena L.¹; Farías, Alejandro R.¹; Jorge, Nelly L.²; Vullo, Diana L.³.

1: Grupo de Investigación sobre Temas Ambientales y Químicos
Facultad Regional Resistencia
Universidad Tecnológica Nacional
3500

e-mail: pabloncuadra@gmail.com; gimenalilianfontana@gmail.com, alefa33@gmail.com

2: Laboratorio de Investigaciones en Tecnología Ambiental
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura
Universidad Nacional del Nordeste
3400

e-mail: nelly.jorge@gmail.com

3: Instituto de Ciencias
Área de Química
Universidad Nacional General Sarmiento-CONICET
1613

e-mail: dvullo@campus.ungs.edu.ar

Resumen. *La expansión de la actividad agrícola ha impulsado el uso de agroquímicos, cuya permanencia en los suelos puede provocar serios problemas de contaminación. Su infiltración hacia las aguas subterráneas o escurrimientos hacia cursos de agua superficiales, como también la deposición de éstos en las cadenas tróficas implican un riesgo latente para el equilibrio de los ecosistemas. El presente trabajo posee como objetivos aislar bacterias autóctonas a partir de suelos agrícolas en presencia de una mezcla de agroquímicos (glifosato, clomazone e imazapir-imazapic) para utilizarlas potencialmente en ensayos de recuperación de suelos contaminados. Las muestras de suelo fueron tomadas de tres zonas de un campo destinado al cultivo de arroz: 1. zona virgen sin aplicaciones registradas de plaguicidas (ZA), 2. zona sin aplicaciones desde hace 1 década (ZB), y 3. zona de cultivos con aplicación continua de agroquímicos (ZC). Primeramente, para explorar la población microbiana cultivable resistente a los plaguicidas mencionados, se realizó un recuento en placa por siembra en superficie sobre dos medios de cultivo: medio nutritivo (Agar para recuento=APC) y medio oliogotrófico simulando el entorno natural (Agar Suelo=AS) tanto en presencia como en ausencia de agroquímicos (CP y SP respectivamente). Se obtuvieron diferencias tanto en los recuentos como en la diversidad de colonias acorde a la zona de muestreo, a la composición del medio y a la presencia de plaguicidas. Se observó una mayor disminución en UFC/g correspondiente a ZA en los medios suplementados con agroquímicos, consistente con sus antecedentes de no exposición, no así con ZB y ZC. Ante la diversidad de colonias desarrolladas en AS-CP y APC-CP; se aislaron y purificaron en tres pasos 15 cepas. Estos aislamientos serán utilizados en ensayos de biodegradación de plaguicidas para utilizarlas potencialmente en procesos de biorremediación a futuro.*

Palabras clave: Agroquímicos, Bacterias autóctonas, suelo, biodegradación.

1. INTRODUCCION

La expansión de la actividad agrícola en los últimos años ha conllevado a un incremento en las aplicaciones de agroquímicos, para combatir diferentes tipos de plagas. La Organización Mundial de la Salud (OMS), define al producto fitosanitario, plaguicida o agroquímico, como “la sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir la acción de, o destruir directamente, insectos, ácaros, moluscos, roedores, hongos, malas hierbas, bacterias y otras formas de vida animal o vegetal perjudiciales para la salud pública y también para la agricultura”. Inclúyase en esta definición las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal o fitorreguladores. Este tipo de sustancias pueden resultar nocivas para los medios receptores, provocando alteraciones ecológicas en suelos, debido a que eliminan controles biológicos naturales (Sterren et al. 2016), y provocan alteraciones en la composición fisicoquímica de los mismos. Por otro lado, pueden contaminar cursos acuáticos como consecuencia de procesos de lixiviación o transporte vertical de los mismos hacia las napas freáticas subterráneas o por escorrentía hacia fuentes de agua superficiales (Vizgarra, 2018). A su vez los plaguicidas se depositan en las cadenas tróficas (Leal Soto et al. 2013), de tal manera que podrían causar efectos perjudiciales en la salud humana (Pino et al. 2011).

Existen diferentes métodos que permiten remover estos contaminantes del suelo, entre los cuales, se destacan los tratamientos biológicos, por ser más económicos y ambientalmente eficientes, con respecto a tratamientos fisicoquímicos de remoción (Romero et al. 2021).

Sviridov et al., (2014) demostró la biodegradación de clorpirifos con *Bacillus pumilus*, *Flavobacterium* sp. y de glifosato con *Pseudomonas* sp., *Stalinococcus* sp. y *Achromobacter* sp.; de igual manera Marín y Jaramillo, (2015) utilizaron *Bacillus* sp. y *Pantoea agglomerans* para remover clorpirifos. A su vez, para la biodegradación de carbofurfuran en suelos contaminados, Romero et al., (2021) utilizó *Trichoderma* sp. y Rico et al., (2018), *Pseudomonas* sp., *Serratia marcescens* y *Bacillus mycoides*.

La mayoría de las investigaciones mencionadas anteriormente, trabajan con cepas nativas, aisladas de ambientes donde existe presencia de los plaguicidas estudiados. El aislamiento de bacterias autóctonas capaces de metabolizar productos fitosanitarios ha recibido considerable atención porque éstas proporcionan un método ecológico de desintoxicación in situ. En algunos ambientes contaminados, las poblaciones microbianas autóctonas han evolucionado con el tiempo para adaptarse a estos contaminante, (Ortíz Hernández y Sánchez Salinas, 2010), obteniendo de los mismos C, N, P o energía de sus moléculas. Por lo tanto, estos sitios son los nichos ecológicos más apropiados para encontrar y aislar cepas capaces de degradar agroquímicos (Barberis et al. 2019). La importancia de la población autóctona radica en que la misma ya está presente y adecuada al ambiente subsuperficial, y tienen una buena distribución espacial en la superficie del suelo (Adams et al. 2015).

Por tal motivo el objetivo de este trabajo es aislar bacterias autóctonas, a partir de muestras de suelos de cultivos de arroz en presencia de una mezcla de agroquímicos (glifosato, clomazone, imazapic/imazapir) para utilizarlas en ensayos de recuperación de suelos contaminados.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Muestreo de suelo y conservación de muestras

Las muestras de suelo fueron tomadas de tres zonas de un campo destinado al cultivo de arroz, ubicado en la localidad de La Leonesa, Provincia de Chaco, Argentina (Figura 1): 1. zona virgen sin aplicaciones registradas de plaguicidas (ZA), 2. zona sin aplicaciones desde hace 1 década (ZB), y 3. zona de cultivos con aplicación continua de agroquímicos (ZC).

Para llevar a cabo el muestreo, se recorrió cada una de las zonas antes mencionadas en forma de zig-zag, y se recolectaron 10 sub-muestras de ZA, 15 de ZB y 15 de ZC. Las mismas se tomaron mediante la utilización de una pala, con la cual se abrieron hoyos de aproximadamente 25 x 25 cm de lado entre 20 y 30 cm de profundidad, con un peso aproximado de 250 g, retirando 2 cm de suelo más superficiales. De manera simultanea se recolectó una porción de cada una de ellas en recipientes estériles, que se utilizaron posteriormente para el aislamiento de bacterias. Todas las sub-muestras se mezclaron homogéneamente para generar una muestra compensada por cada zona de muestreo. Las mismas fueron conservadas a 4°C hasta su procesamiento.



Figura 1. Zonas de muestreo

2.3. Preparación de medios de cultivo

Se prepararon 3 medios de cultivo diferentes para realizar el recuento y selección de colonias bacterianas resistentes a la mezcla de plaguicidas (glifosato, clomazone, imazapir-imazapir 3,3 g/L, en relación 1:1:1).

2.3.3. Agar para recuento (APC)

El APC fue preparado de acuerdo con la siguiente composición (g/L: triptona 5, glucosa 1, extracto de levadura 2.5, agar 12). La suspensión resultante se hirvió durante 2 minutos y se distribuyó en recipientes adecuados para su posterior esterilización en autoclave. El medio de cultivo obtenido (APC-SP) se fraccionó en dos mitades, para añadir a una de ellas la mezcla de agroquímicos, previamente esterilizados por filtración, en concentración 0,1% V/V, para obtener APC-CP.

2.3.4. Agar suelo (AS)

Este medio de cultivo fue preparado de acuerdo con la siguiente composición (suelo 125 g/L, glucosa 1% (m/v), agar 15.2 g/L. El suelo utilizado para su preparación fue previamente secado en estufa a 105°C durante 24 hs, morterizado y tamizado con tamiz de malla 30. Se realizó una suspensión en agua destilada, del suelo previamente tratado y se filtró mediante un equipo de filtración al vacío. Al filtrado resultante, se le adicionaron los demás reactivos que constituyen el medio, y se esterilizaron. Se prepararon 3 AS correspondientes a cada zona muestreada, obteniendo de esta manera: AS-ZA-SP (agar suelo de la zona A sin plaguicidas), AS-ZB-SP (agar suelo de la zona B sin plaguicidas) y AS-ZC-SP (agar suelo de la zona C sin plaguicidas). Para obtener los medios con presencia de agroquímicos, se dividió a la mitad a los obtenidos previamente y se les adicionó la mezcla de contaminantes en concentración 0,1% V/V; resultando de esta manera AS-ZA-CP (agar suelo de la zona A con plaguicidas), AS-ZB-CP (agar suelo de la zona B con plaguicidas) y AS-ZC-CP (agar suelo de la zona C con plaguicidas).

2.4. Recuento de Unidades Formadoras de Colonias por g de suelo (UFC/g)

Se efectuó una estimación del número de bacterias aerobias viables cultivables totales y resistentes a la mezcla de plaguicidas antes mencionada, mediante la técnica de recuento en placa en dos medios de cultivo, uno oligotrófico (AS) y otro nutritivo tradicional (APC), en presencia y ausencia de plaguicidas. Para ello se sembraron diluciones al décimo de las muestras de suelo en placas con AS-CP y AS-SP. Todas las siembras se incubaron a 30°C, durante 48 h las correspondientes a APC y durante 7 días las que contenían AS.

2.5. Aislamiento y purificación de colonias

Para llevar a cabo el aislamiento de colonias bacterianas resistentes a la mezcla de agroquímicos, se partió de las placas de recuento en ambos medios de cultivos con presencia de contaminantes, y se seleccionaron aquellas que presentaban características macroscópicas

diferentes. Las mismas fueron sembradas por estriado en los medios de cultivo de origen y purificadas por triplicado por pasajes sucesivos en el mismo medio.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Recuento de UFC/g suelo

La tabla 1 presenta los resultados del recuento expresados en UFC/g de suelo, realizado en todos los medios de cultivos en ausencia y presencia de agroquímicos.

Tabla 1. Resultados de Recuento de colonias en ambos medios de cultivo

Zona de Muestreo	UFC/g			
	APC		AS	
	SP	CP	SP	CP
ZA	$(2,0\pm 2,0)\times 10^6$	$(1,0\pm 0,5)\times 10^5$	$(7,4\pm 1,2)\times 10^5$	$(1,8\pm 0,6)\times 10^5$
ZB	$(8,0\pm 0,4)\times 10^6$	$(1,1\pm 0,5)\times 10^6$	$(1,5\pm 0,6)\times 10^7$	$(2,1\pm 0,6)\times 10^6$
ZC	$(2,6\pm 0,6)\times 10^6$	$(4,0\pm 3,0)\times 10^5$	$(7,0\pm 1,2)\times 10^6$	$(5,0\pm 1,0)\times 10^4$

Teniendo en cuenta las limitaciones que presenta el recuento de microorganismos cultivables, cuando se trabaja con muestras naturales, se pudieron observar diferencias tanto en los UFC/g como en la diversidad de colonias acorde a la zona de muestreo, a la composición del medio y a la presencia de plaguicidas. Se registró una mayor disminución en UFC/g correspondiente a ZA en los medios suplementados con agroquímicos, consistente con sus antecedentes de no exposición, no así con ZB y ZC.

Cabe destacar que las poblaciones microbianas cultivables que habitualmente se desarrollan en APC, suelen ser diferentes a las desarrolladas en AS, dada la naturaleza de la composición de los medios de cultivo.

3.2. Aislamiento y purificación de colonias

Se logró el aislamiento de colonias bacterianas resistentes a la mezcla de plaguicidas antes mencionada, en todos los medios de cultivo.

3.2.1. Colonias aisladas en AS-ZA-CP

En AS-ZA-CP, se aislaron 2 colonias denominadas A1 (Figura 2) y A4 (Figura 3), cuyas características morfológicas se presentan en la Tabla 2.



Figura 2. Colonia A1



Figura 3. Colonia A4

Tabla 2. Características macroscópicas de colonias A1 y A4

Características Macroscópicas	A1	A4
Color	Incolora	Blanca
Forma	Irregular	Puntiforme
Borde	Entero	Entero
Elevación	Convexa	Plana
Aspecto óptico	Opaca	Brillosa
Consistencia	Seca	Cremosa

3.2.2. Colonias aisladas en AS-ZB-CP

Se aislaron 2 colonias bacterianas en AS-ZB, denominadas B4 (Figura 4) y B8 (Figura 5), cuyas características macroscópicas se detallan en la Tabla 3.



Figura 4. Colonia B4



Figura 5. Colonia B8

Tabla 3. Características macroscópicas de colonias B4 y B8

Características Macroscópicas	B4	B8
Color	Naranja	Salmón
Forma	Filamentosa	Puntiforme
Borde	Filamentoso	Entero
Elevación	Plana	Plana
Aspecto óptico	Opaca	Opaca
Consistencia	Seca	Cremosa

3.2.2. Colonias aisladas en AS-ZC-CP

En AS-ZC, se aisló la colonia C5 (Figura 6), cuyas características macroscópicas se presentan en la Tabla 4.

**Figura 6.** Colonia C5**Tabla 4.** Características macroscópicas de la colonia C5

Características Macroscópicas	C5
Color	Verde
Forma	Puntiforme
Borde	Entero
Elevación	Plana
Aspecto óptico	Opaca
Consistencia	Seca

3.2.3. Colonias aisladas en APC

Se aislaron 15 colonias de bacterias en APC, que fueron clasificadas de acuerdo a la zona de la cual fueron extraídas: colonias D, de ZA; colonias E de ZB, y colonias F, de ZC.

3.2.3.1. Colonias D

Se aislaron 3 colonias clasificadas con la letra D, cuya denominación es: D3, D6, D7. Las mismas se visualizan en las figuras 7, 8 y 9 respectivamente y sus características macroscópicas en la tabla 5.

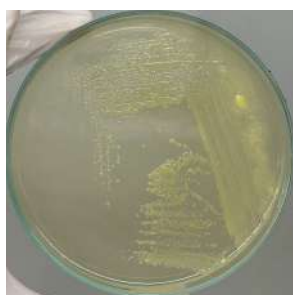


Figura 7. Colonia D3

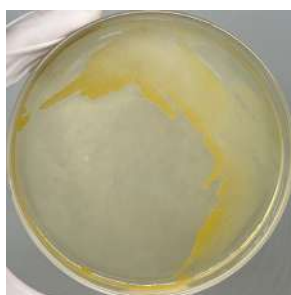


Figura 8. Colonia D6



Figura 9. Colonia D7

Tabla 5. Características macroscópicas de la colonias D

Características Macroscópicas	D3	D6	D7
Color	Amarilla	Amarilla	Transparente
Forma	Puntiforme	Irregular	Irregular
Borde	Entero	Entero	Entero
Elevación	Plano	Plano	Plano
Aspecto óptico	Opalescente	Opaco	Traslúcido
Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa

3.2.3.2. Colonias E

Se logró el aislamiento de 8 cepas obtenidas a partir de ZB, en el medio nutritivo APC-CP. Las mismas fueron denominadas como E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 y E8, que se visualizan en las Figuras 10 a 17 respectivamente, y sus características macroscópicas en la Tabla 6.



Figura 10. Colonia E1

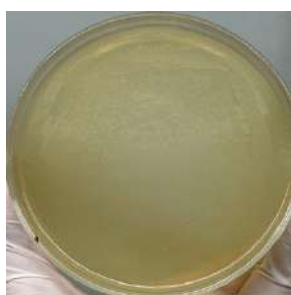


Figura 11. Colonia E2

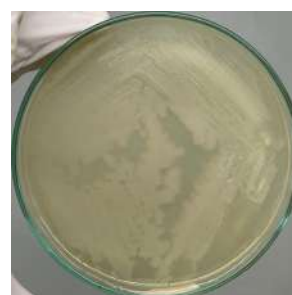


Figura 12. Colonia E3



Figura 13. Colonia E4



Figura 14. Colonia E5



Figura 15. Colonia E6



Figura 16. Colonia E7



Figura 17. Colonia E8

Tabla 6. Características macroscópicas de la colonias E

Características Macroscópicas	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Color	Blanco	Blanca	Blanco	Salmón	Transparente	Amarillo	Blanco	Amarillo
Forma	Círculo	Puntiforme	Irregular	Irregular	Puntiforme	Puntiforme	Puntiforme	Puntiforme
Borde	Entero	Entero	Ondulado	Lobulado	Entero	Entero	Ondulado	Ondulado
Elevación	Convexo	Plano	Plano	Plano	Plano	Convexo	Elevado	Convexo
Aspecto óptico	Opalescente	Opalescente	Opalescente	Opalescente	Opaco	Opalescente	Opaco	Opaco
Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa

3.2.3.3. Colonias F

Las Figuras 18 a 21, muestran las colonias aisladas en APC-CP, a partir de ZC, denominadas como F1, F6, F7 y F9 respectivamente. Sus características morfológicas se visualizan en la Tabla 7.



Figura 18. Colonia F1



Figura 19. Colonia F6



Figura 20. Colonia F7



Figura 21. Colonia F9

Tabla 7. Características macroscópicas de la colonias F

Características Macroscópicas	F1	F4	F7	F9
Color	Amarillo	Blanco	Blanco	Amarillo
Forma	Puntiforme	Círculo	Círculo	Círculo
Borde	Entero	Entero	Entero	Entero
Elevación	Convexo	Umbilicado	Convexo	Convexo
Aspecto Optico	Opalescente	Opaco	Opalescente	Opalescente
Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa

En todos los casos se aislaron colonias de bacterias con características morfológicas diferentes, en presencia de la mezcla de agroquímicos. Se puede observar que aquellas que se desarrollaron en AS presentan un tamaño menor que las aisladas en APC.

Por otro lado, el número de colonias aisladas, a partir de la muestra de suelo virgen (ZA), es menor, con respecto a las aisladas a partir de las zonas que estuvieron en contacto con agroquímicos. La diversidad microbiana sufrió un proceso de selección al estar en contacto en forma crónica con los productos fitosanitarios, que se traduce, en un mayor número de aislamientos de microorganismos resistentes.

4. CONCLUSIONES

-Teniendo en cuenta los recuentos obtenidos, las bacterias aisladas de las zonas con antecedentes de uso de agroquímicos (ZB y ZC), están mejor adaptadas al contacto con estos contaminantes, con respecto a aquellas aisladas en la zona virgen (ZA).

-A partir de suelos productivos, se logró el aislamiento de 20 colonias bacterianas en presencia de la mezcla de glifosato, clomazone, imazapic/imazapir, de las cuales 2 se aislaron en el medio oligotrófico AS-ZA, 2 en AS-ZB, 1 en AS-ZC y las restantes en el medio nutritivo tradicional APC.

-Dado el potencial biotecnológico de las mismas, serán utilizadas posteriormente en ensayos de resistencia a concentraciones crecientes de plaguicidas y en ensayos de biodegradación de estos contaminantes en medio líquido.

5. BIBLIOGRAFIA

Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., & Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1), 28-39.

Leal Soto, S. D., Valenzuela Quintanar, A. I., Gutiérrez Coronado, M. D. L., Bermúdez Almada, M. D. C., García Hernández, J., Aldana Madrid, M. L., & Valenzuela Navarro, C. P. (2014). Residuos de plaguicidas organoclorados en suelos agrícolas. *Terra latinoamericana*, 32(1), 1-11.

Marín, L. F., & Jaramillo, B. (2015). Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina. *Revista chilena de nutrición*, 42(2), 179-185.

Ortiz-Hernández, M., & Sánchez-Salinas, E. (2010). Biodegradation of the organophosphate pesticide tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agricultural soils in México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 26(1), 27-38.

Pino, N., & Peñuela, G. (2011). Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(6), 827-831.

Rico, L. P. B., Garcia, A. L. C., & Martínez, R. R. (2018). Bacterias con potencial para biodegradar Carbofurano en suelos cultivados con papa criolla *Solanum phureja*. *BISTUA Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 16(2), 88-94.

Romero, A. E., Yañez, L. M., Maldonado, M. J., Choque, D. A., & Ávila, M. E. N. (2021). Biodegradación de Carbofuran por una cepa de *Trichoderma sp.* autóctona y su potencial uso para la biorremediación de suelos contaminados. *Revista Científica FCA*, 14(2).

Sterren, M. A., Uhrich, W., & Benintende, S. (2016). Residualidad de glifosato en suelos de Entre Ríos y su efecto sobre los microorganismos del suelo. *Ecología austral*, 26(3), 246-255.

Sviridov, A. V., Shushkova, T. V., Ermakova, I. T., Ivanova, E. V., Epiktetov, D. O., & Leontievsky, A. A. (2015). Microbial degradation of glyphosate herbicides. *Applied biochemistry and microbiology*, 51(2), 188-195.

Vizgarra, C. G. (2018). Aplicación de agroquímicos en las localidades de Las Palmas y La Leonesa, Provincia del Chaco. Efectos en la salud de la población.