

Ensayos de resistencia en medios de cultivo sólidos de colonias bacterianas autóctonas en presencia del herbicida Kifix®

Resistance tests in solid culture media of autochthonous bacterial colonies in the presence of the herbicide Kifix®

María Florencia VIERA

Grupo de Investigación Sobre Temas Ambientales y Químicos, FRRe, UTN
E-mail: vieraflor98@ca.frre.utn.edu.ar

Lautaro DELGADO

Grupo de Investigación Sobre Temas Ambientales y Químicos, FRRe, UTN
E-mail: lautaro.delg21@ca.frre.utn.edu.ar

María Florencia SÁNCHEZ IRIGOYEN

Grupo de Investigación Sobre Temas Ambientales y Químicos, FRRe, UTN
E-mail: mariaflorenciasi@ca.frre.utn.edu.ar

Paula AYALA BENGLER

Grupo de Investigación Sobre Temas Ambientales y Químicos, FRRe, UTN
E-mail: ayalabpaula@ca.frre.utn.edu.ar

Pablo Nicolás CUADRA

Grupo de Investigación Sobre Temas Ambientales y Químicos, FRRe, UTN
E-mail: pabloncuadra@ca.frre.utn.edu.ar

Resumen

El presente trabajo tiene como objeto evaluar la resistencia de un grupo de 30 bacterias al herbicida Kifix®, aisladas previamente en trabajos anteriores a partir de diferentes muestras de suelo de un cultivo arrocero ubicado en la localidad de Las Palmas, Chaco, con la finalidad de identificar aquellas que presenten mayor potencial de biodegradación para ser utilizadas en posteriores ensayos.

Para ello, se realizó la inoculación de estos microorganismos mediante la técnica de estriado en placa de Petri, utilizando medios de cultivo nutritivos y oligotróficos, dosificados con concentraciones crecientes del contaminante. La evaluación del crecimiento bacteriano se llevó a cabo mediante observaciones macroscópicas de las siembras realizadas durante periodos de tiempo específicos.

Los resultados obtenidos demostraron que 15 cepas son capaces de desarrollarse en un medio nutritivo tradicional y 12 en medios oligotróficos con concentraciones considerables

del plaguicida, por lo que se pretende continuar con los ensayos a concentraciones más elevadas del agroquímico.

Palabras clave: Kifix®, bacterias, ensayos de resistencia, biodegradación

Abstract

The objective of this work is to evaluate the resistance of a group of 30 bacteria to the herbicide Kifix®, previously isolated in previous works from different soil samples of a rice crop located in the town of Las Palmas, Chaco, with the purpose of identify those that have the greatest potential for biodegradation to be used in subsequent tests.

For this, the inoculation of these microorganisms was carried out using the technique of streaking in a Petri dish, using nutritive and oligotrophic culture media, dosed with increasing concentrations of the contaminant. The evaluation of the bacterial growth was carried out by means of macroscopic observations of the sowings carried out during specific periods of time. The results obtained showed that 15 strains are capable of developing in a traditional nutrient medium and 12 in oligotrophic media with considerable concentrations of the pesticide, so it is intended to continue with the tests at higher concentrations of the agrochemical.

Keywords: Kifix®, bacteria, resistance test, biodegradation

Introducción

Los plaguicidas son ampliamente utilizados en la agricultura y la industria en todo el mundo debido a su utilidad, ya que mantienen o aumentan el rendimiento de las cosechas, algo especialmente importante en los países que sufren escasez de alimentos. El advenimiento de la tecnología Clearfield® con el uso del herbicida Kifix® (imazapir + imazapic) permitió controlar selectivamente el arroz maleza (arroz rojo), especie congénere del arroz cultivado, junto a otras malezas de una manera sencilla y muy práctica (Mendoza et al., 2011), siendo extremadamente importante su utilización en los sistemas de cultivo donde la disponibilidad de agua es limitada (Rangel et al., 2018). El imazapir y el imazapic pertenecen a la familia de las imidazolinonas, siendo ambos inhibidores de una enzima que participa en la síntesis de los aminoácidos ramificados leucina, isoleucina y valina. Ambos herbicidas pueden presentar una vida media en el suelo superior a los 100 días, por lo que tienen el potencial de interferir con los cultivos subsiguientes en la rotación con el arroz. Además, presentan un alto riesgo de lixiviación y de contaminación del agua subterránea, así como una prolongada persistencia en el suelo. Su disipación depende de la actividad microbiana, por lo que su degradación es afectada por el contenido de la materia orgánica en el suelo, presencia de oxígeno, humedad

y temperatura (Saldain y Sosa, 2014).

Los tratamientos biológicos son la alternativa más interesante en la actualidad debido a las ventajas que ofrecen, transformando estos compuestos peligrosos en compuestos más simples (Rodríguez et al., 2012) y menos tóxicos (Romero et al., 2021), en condiciones de temperatura y presión atmosféricas, lo que lleva a reducir considerablemente gastos de capital y de operación. Para la biodegradación producida por bacterias, el plaguicida podrá servir idealmente como la única fuente de carbono y energía para los microorganismos, incluyendo la síntesis de las enzimas apropiadas para la transformación de este, proporcionando un mecanismo importante en la degradación de compuestos xenobióticos en el ambiente (Murugesan y Maheswari, 2010).

El presente estudio pretende evaluar la capacidad de las bacterias aisladas de desarrollarse en medios de cultivos sólidos contaminados con Kifix®.

Desarrollo

1. Ensayos de resistencia

Para determinar la concentración máxima a la cual resisten las colonias se prepararon los siguientes medios de cultivo: agar para recuento (APC), agar M9 (AM9) y agar suelo (AS) para las zonas A y B (AS-ZA y AS-ZB; respectivamente). Es importante mencionar que la zona A no registra aplicaciones de agroquímicos mientras que la zona B tuvo una exposición a los mismos.

La composición de los medios cultivos fueron las siguientes:

Medio de cultivo	Composición	
APC	<ul style="list-style-type: none"> ○ Peptona 5 g/l. ○ Glucosa 1 g/l. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Extracto de levadura 2,5 g/l. ○ Agar bacteriológico 12 g/l.
AM9	<ul style="list-style-type: none"> ○ Fosfato monopotásico 6 g/l. ○ Fosfato dipotásico 12 g/l. ○ Cloruro de amonio 2 g/l. ○ Cloruro de sodio 1 g/l. ○ Extracto de levadura 2% m/v: 10 ml/l. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Agar bacteriológico 30 g/l. ○ Cloruro de calcio 1 M: 1 ml. ○ Sulfato de magnesio 1 M: 2,2 ml. ○ Glucosa 40% m/v: 10 ml.
Agar suelo Zonas A y B	<ul style="list-style-type: none"> ○ Cantidad de suelo correspondiente a cada zona: 62,5 g/l. ○ Glucosa 40% m/v: 25 ml. ○ Agar bacteriológico: 15,2 g/l. 	

Tabla 1. Composición de cada medio de cultivo.

2. Preparación de las placas de Petri

Las bacterias utilizadas fueron aisladas previamente en el trabajo realizado por Cuadra et al., 2022, recibiendo la siguiente denominación: A1, A4, B4, B8, D3, D6, D7, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, F1, F4, F6, F7, F8, F9, G1, G2, H1, H2, H3, H4, H5, I2 y J1.

Para finalizar la preparación de cada medio de cultivo fue necesaria la adición del agroquímico a cada recipiente que los contenía, partiendo de concentraciones de 3,3 g/L y aumentando gradualmente en la misma cantidad hasta alcanzar la concentración final ensayada. La siembra de las colonias en cada medio de cultivo fue realizada según lo indicado en la Tabla 2.

Medio de cultivo	APC	AM9	Agar suelo Zona A	Agar suelo Zona B
Cepas	D3, D6, D7, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, F1, F4, F6, F7, F8, F9	G1, G2, H1, H2, H3, H4, H5, I2, J1	A1, A4	B4, B8

Tabla 2. Distribución de cepas bacterianas en cada medio.

3. Lectura de Resultados

Fue llevada a cabo mediante la observación macroscópica sobre el estriado realizado en cada placa en días diferentes de acuerdo al tipo de medio, resultando positivas aquellas que presentaban un crecimiento sobre la estría realizada (Imagen 1), negativas aquellas que no presentaban un crecimiento y no concluyente aquellos que no aportaban información suficiente en cuanto al crecimiento. La temperatura de incubación de todas las colonias fue a 30 °C.

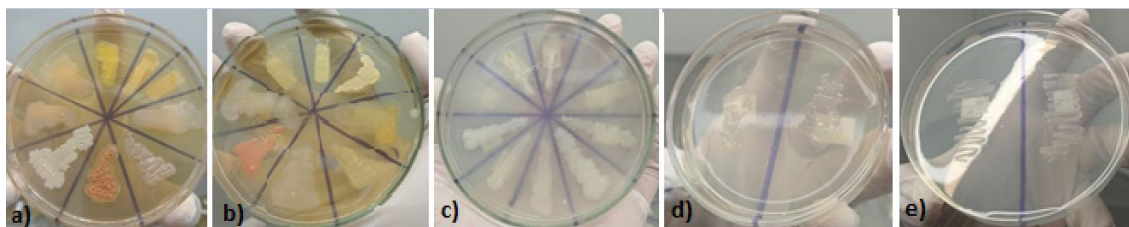


Imagen 1. Crecimiento de colonias bacterianas. a) y b) Cepas D3-F9 en APC, c) Cepas G1-J1 en AM9, d) Cepas A1 y A4 en AS-ZA, e) Cepas B4 y B8 en AS-ZB.

Resultados

a. Ensayos de resistencia de colonias en APC

Los resultados en APC fueron visualizados a los 5 días, y a partir de los mismos, se infiere que la

colonia F8 tiene una resistencia a este plaguicida hasta una concentración igual al 9% V/V; mientras que en la colonia E1 no fue posible observar crecimiento a partir de 6% V/V. El resto de las colonias, llegaron a tolerar concentraciones de hasta el 20% V/V. En las Tablas 3 y 4 se resumen los resultados.

Concentración % (V/V)	D3	D6	D7	F1	F4	F6	F7	F8	F9
6	+	+	+	+	+	+	+	N/C	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	N/C	+
15	+	+	+	+	+	+	+	N/C	+
20	+	+	+	+	+	+	+	N/C	+

Tabla 3. Ensayo de resistencia en APC colonias D3 a F9

Concentración % (V/V)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
6	-	+	+	+	+	+	+	+
7	-	+	+	+	+	+	+	+
8	N/C	+	+	+	+	+	+	+
9	N/C	+	+	+	+	+	+	+
10	N/C	+	+	+	+	+	+	+
15	-	+	+	+	+	+	+	+
20	-	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 4. Ensayo de resistencia en APC colonias E1 a E8.

Nota: la abreviatura N/C corresponde a un ensayo "No Concluyente".

b. Ensayos de resistencia de colonias en AM9

Las lecturas de resultados en AM9 se efectuaron a los 6 días. Se puede observar que la colonia G1 tiene una resistencia a este plaguicida hasta una concentración igual al 20% V/V. El resto de las colonias, llegaron a tolerar concentraciones de hasta el 25% V/V. En la Tabla 5 se resumen los resultados.

Concentración % (V/V)	G1	G2	H1	H2	H3	H4	H5	I2	J1
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+

18	N/C	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	N/C	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 5. Ensayo de resistencia en AM9 colonias G1 a J1.

c. Ensayos de resistencia de colonias en AS ZA y ZB

Las lecturas de resultados en agar suelo para ambas zonas se efectuaron a los 6 días. Las concentraciones ensayadas son mucho menores que en los medios APC y AM9 debido a que en ensayos anteriores se observó su menor resistencia en este medio. En este caso, todas las colonias en AS llegaron a tolerar concentraciones de hasta un 5%.

Discusión

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se demostró que 15 cepas son capaces de desarrollarse en un medio nutritivo tradicional hasta concentraciones del 20 %V/V del plaguicida mientras que 12 cepas en medios oligotróficos, particularmente hasta concentraciones del 25% V/V para el caso de AM9 y hasta un 5% en AS, de ambas zonas. Se observó que la mayoría de las colonias de microorganismos poseen la capacidad de desarrollarse en altas concentraciones a las 24 horas en medios nutritivos, aunque en los casos de F1, F6, E2 y E8 necesitan mayor tiempo de incubación para desarrollarse a la máxima concentración ensayada. Debido a ello, se puede intuir que estas últimas presentan menor resistencia a este plaguicida.

En los próximos ensayos se pretende aumentar la concentración de plaguicida hasta alcanzar el máximo valor tolerado por cada colonia que hasta el momento desarrollaron crecimiento sin inconvenientes en las concentraciones ensayadas.

Conclusiones

Puesto que el tiempo para la realización de los ensayos de resistencia fue limitado, no ha sido posible hallar las concentraciones máximas de Kifix® a las que son capaces de resistir la mayoría de estas colonias. Sin embargo, fue posible determinar la concentración inhibitoria de 3 cepas, por lo que se pudo cumplir en parte con el objetivo propuesto.

Se prevé seguir avanzando en la investigación realizando ensayos con concentraciones mayores del contaminante mencionado hasta alcanzar aquellas en donde no se aprecie crecimiento de los microorganismos restantes.

Agradecimientos

Al Grupo de Investigación GISTAQ, por abrirnos sus puertas y permitir que nos iniciemos en la

investigación, lo cual nos brinda una formación integral como futuros profesionales.

Referencias bibliográficas

Beshay, U., Desouky, A.-E.-H., Hassan, M., & Sahar, Z. (2002). Phenol biodegradation by free and immobilized *Acinetobacter*. *Biotechnology Letters*, 24, 1295-1297.

Cuadra, P., Fontana, G., Farías, A., Jorge, N., & Vullo, D. (2022). Aislamiento de bacterias autóctonas de suelos de cultivos de arroz con aplicaciones periódicas de agroquímicos. Congreso VIII PROIMCA, VI PRODECA, Villa María, Córdoba, Argentina. Junio 2022.

Mendoza, J., Perea, Y., Salvador, J., Morales, J., & Pérez, G. (2011). Biodegradación bacteriana de plaguicidas permetrina y cipermetrina en cultivo lote. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 2(3), 45-55. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/3236/323627683005.pdf>

Murugesan, A., Jeyasanthi, T., & Maheswari, S. (2010). Isolation and characterization of cypermethrin utilizing bacteria from Brinjal cultivated soil. *African Journal of Microbiology Research*, 4(1), 10-13.

Rangel, P. H., Ferreira, M. E., de Brito Fragoso, D., Centeno Cordeiro, A., Crisley Lacerda, M., Martins Santiago, C., Santos, D. (2018). BRS A702 CL: new early-maturing irrigated rice cultivar with herbicide tolerance. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 18, 446-449. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332018v18n4c66>

Rodríguez, N. J. P., Carvajal, S., Gallo, A., & Peñuela, G. (2012). Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diesel. *Producción+ Limpia*, 7(1).

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).

Saldain, N., López, A., & Sosa, B. (2014). Persistencia y actividad biológica del Kifix® en suelos arroceros en el este de Uruguay. En *Manejo de Malezas en Arroz* (págs. 17-19). Colonia, Uruguay. Obtenido de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/3994/1/Ad-735-5ManejoMalezas-17-19.pdf>