

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE
GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Aislamiento y caracterización de bacterias
tolerantes al herbicida Glifosato en muestras
de suelo.

Karin Nicolle Richter López

Guatemala

2011

Aislamiento y caracterización de
bacterias tolerantes al herbicida
Glifosato en muestras
de suelo.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE
GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

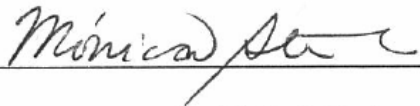
Aislamiento y caracterización de bacterias
tolerantes al herbicida Glifosato en muestras
de suelo

Trabajo de investigación presentado por Karin
Nicolle Richter López para optar al grado académico
de Licenciado en Bioquímica y Microbiología.

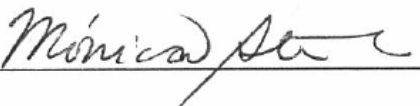
Guatemala

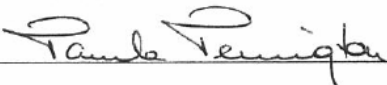
2011


Vo.Bo.:

(f) 
Ph.D. Mónica Stein

Terna examinadora:

(f) 
Ph.D. Mónica Stein

(f) 
Ph. D. Pamela Pennington

(f) 
Lic. Osbel Nuñez

Fecha de aprobación: 2 de Junio 2011

PREFACIO

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el inicio del primer proyecto de parte del Instituto en Biotecnología, a cargo por la Dra. Mónica Stein. Esto se llevó a cabo y continúa en las instalaciones del Laboratorio de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala, ya que éste presenta el equipo e instalaciones adecuadas al proyecto. Para ello también se contó con la colaboración de la Directora del Departamento de Bioquímica y Microbiología, Dra. Pamela Pennington.

El estudio inició desde inicio de año 2010, realizando cotizaciones de material y ciertos equipos para poder llevar a cabo la investigación. Este es el proyecto FODECYT 06-2010, financiado por la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT). El estudio fue dirigido por la Dra. Mónica Stein quien también fue mi asesora de tesis. Es un trabajo de investigación en el que se contó con poca literatura para el protocolo, por lo que muchas cosas se llevaron a cabo basado en experiencias y en prueba y error. La primera fase del proyecto, que es este trabajo de investigación, finalizó en mayo del 2011.

Agradezco a mis padres, quienes siempre me apoyaron desde el inicio de la carrera hasta el final de este trabajo de investigación y me dieron la oportunidad de optar a un grado de licenciatura en esta casa de estudios.

Agradezco principalmente a la Dra. Mónica Stein, quien fue mi catedrática de dos clases durante la carrera en 4to año y en 5to año asesora de trabajo de graduación, quien me dio la oportunidad de entrar al proyecto desde el inicio para realizar las prácticas profesionales para luego continuar como tesista dentro del proyecto. También por su apoyo y guía desde que inició siendo mi catedrática. Agradezco a Nohemy Zelada, encargada de Laboratorio de Bioquímica y Microbiología, quien trabajando en el proyecto como técnico de laboratorio, siempre estuvo atenta y apoyando para que no faltara material y todo permaneciera en orden. También a Maria Cristina Bolaños, estudiante de la carrera, quien continuara con el siguiente paso de este trabajo de investigación, inició meses antes que esta fase terminara brindando su ayuda y colaboración para que todo caminara en orden.

Agradezco a la terna examinadora que fueron el Lic. Osbel Nuñez, Dra. Pamela Pennington y Dra. Mónica Stein. Quienes no solo examinaron el trabajo, sino brindaron apoyo y respondieron a todas las dudas que se presentaron en el camino con mucha dedicación.

ÍNDICE

	Página
PREFACIO.....	iv
LISTA DE CUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	x

Capítulos

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	10
III. OBJETIVOS.....	11
IV. MÉTODOS.....	12
V. RESULTADOS.....	19
VI. DISCUSIÓN.....	45
VII. CONCLUSIONES.....	56
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	57
IX. ANEXOS.....	61

LISTA DE CUADROS

Cuadro

1. Área de recolección de muestras de bacterias de suelo sometidas al herbicida glifosato.....	19
2. Resultados de crecimiento positivo o negativo de todas las muestras de suelo iniciales a distintas concentraciones de glifosato.....	20
3. Resultado de Tinciones Gram de todas las muestras de tierra.....	20
4. de mejor crecimiento bacterial a concentraciones relativamente altas de glifosato.....	21
5. Caracterización fenotípica por medio de la técnica de Tinción de Gram.....	21
6. Tiempo aproximado que demoraba cada bacteria en llegar a una absorbancia de 0.01 midiendo OD ₆₀₀	22
7. Valor de MIC calculado y observado de los controles.....	23
8. Valor P y MIC de la muestra 2, (método Kaplan-Meier).....	24
9. Valor P y MIC de la muestra 3, (método Kaplan-Meier).....	27
10. Valor P y MIC de la muestra 7, (método Kaplan-Meier).....	30
11. Valor P y MIC de la muestra 9A, (método Kaplan-Meier).....	33
12. Valor P y MIC de la muestra 9B, (método Kaplan-Meier).....	36
13. Organismo identificado para cada muestra de tierra por medio de una secuenciación genética de la región 16S.....	40
14. Árbol filogenético de la secuenciación genética de cada muestra.....	41

15. Resumen de resultados obtenidos de todas las muestras y controles.....	42
16. Resultados obtenidos del análisis en BLAST.....	43
17. Resumen de resultados del estudio.....	49
18. Conteo bacteriano control <i>Escherichia coli</i> (UFC).....	66
19. Conteo bacteriano control <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	67
20. Conteo bacteriano de muestra 2.....	68
21. Conteo bacteriano de muestra 3.....	69
22. Conteo bacteriano de muestra 7.....	70
23. Conteo bacteriano de muestra 9 B.....	71
24. Conteo bacteriano de muestra 9 A.....	72
25. Promedios obtenidos de las curvas de crecimiento realizadas en triplicado de cada muestra y de los controles.....	73
26. Valores de desviación estándar obtenidos de cada muestra y controles.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura

1. Estructura de la molécula de glifosato.....	2
2. Promedio de tres curvas de crecimiento a distintas concentraciones de glifosato.....	22
3. Gráfica del promedio de las curvas de crecimiento de la muestra 2 en escala logarítmica comparado con los controles.....	24
4. Gráficas de la función de sobrevivencia acumulada de la muestra 2 comparada con ambos controles.....	25
5. Gráfica del promedio de las curvas de crecimiento de la muestra 3 en escala logarítmica comparado con los controles.....	27
6. Gráficas de la función de sobrevivencia acumulada de la muestra 3 comparada con ambos controles.....	28
7. Gráfica del promedio de las curvas de crecimiento de la muestra 7 en escala logarítmica comparado con los controles.....	30
8. Gráficas de la función de sobrevivencia acumulada de la muestra 7 comparada con ambos controles.	31
9. Gráfica del promedio de las curvas de crecimiento de la muestra 9A en escala logarítmica comparado con los controles.	33
10. Gráficas de la función de sobrevivencia acumulada de la muestra 9A comparada con ambos controles.	34
11. Gráfica del promedio de las curvas de crecimiento de la muestra 9B en escala logarítmica comparado con los controles.	36

12. Gráficas de la función de supervivencia acumulada de la muestra 9B comparada con ambos controles.	37
13. Análisis de supervivencia acumulada de todas las muestras y los controles por el método de Kaplan-Meier.	39
14. Curvas de crecimiento bacteriano en triplicado de control <i>Escherichia coli</i>	67
15. Curvas de crecimiento bacteriano en triplicado de control <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	68
16. Curvas de crecimiento bacteriano en triplicado de control de muestra 2.....	69
17. Curvas de crecimiento bacteriano en triplicado de control de muestra 3.....	70
18. Curvas de crecimiento bacteriano en triplicado de control de muestra 7.....	71
19. Curvas de crecimiento bacteriano en triplicado de control de muestra 9A.....	72
20. Curvas de crecimiento bacteriano en triplicado de control de muestra 9 B.....	73

RESUMEN

El glifosato es un herbicida de amplio espectro no selectivo, que elimina hierbas y arbustos en especial los perennes. Los cultivos resistentes al glifosato poseen un rasgo económicamente importante que puede ser patentado. Esto ya está siendo utilizado masivamente a nivel mundial. El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar bacterias que fuesen tolerantes al herbicida glifosato provenientes de muestras de la tierra de cultivos agrícolas que son sometidos a este herbicida, para así poder aislar bacterias altamente tolerantes de donde se puedan aislar genes libres de patente con confieran la tolerancia. El estudio inició con la recolección de muestras de suelo las cuales se seleccionaron mediante el aislamiento y selección en cajas de Petri con distintas concentraciones de glifosato. Las bacterias que crecieron a mayor concentración fueron resembradas en la misma concentración y aisladas para obtener solamente un tipo de colonias por placa. Éstas se caracterizaron fenotípicamente en cuanto a su capacidad de crecimiento en placas con herbicida y morfológicamente por medio de una tinción Gram. Finalmente se lograron postular cinco aislados como candidatos para realizar en estudios posteriores la clonación y el estudio del gen. Estos cinco aislados se identificaron genéticamente por medio de una secuenciación de la región que codifica el ARN ribosomal 16S. De los cinco aislados seleccionados, cuatro dieron el mismo resultado en la secuenciación. Éstas fueron *Serratia marcescens* ATCC=13880 y una dio resultado *Enterobacter kobei* CCM=2538.

I. INTRODUCCIÓN

A. Antecedentes

Desde hace varios años se ha utilizado el herbicida glifosato para eliminar malezas en los cultivos agrícolas en varios países del mundo, siendo Guatemala es uno de ellos (Entrevista: Ing. Gerardo Espinoza, Ing. Mario Melgar. Cengicaña 2011). La tolerancia a este herbicida es un rasgo deseable a nivel mundial, ya que confiere a cultivos de interés la habilidad de soportar aplicaciones directas de glifosato mientras que las malezas a su alrededor mueren, resultando en menos arado y ahorros para el agricultor. En Estados Unidos principalmente, se han realizado estudios moleculares donde han logrado identificar el gen responsable de esta tolerancia (James, C. 2010). Monsanto, es una empresa que brinda soluciones a los agricultores con tecnologías de última generación para la mejora de sus productos y para aumentar la productividad y calidad de los alimentos (Monsanto, 2010). Esta empresa tiene un gen patentado que confiere tolerancia al glifosato y este no es accesible para todos los agricultores. Estos genes han sido aislados de bacterias que crecen en medios expuestos al glifosato y posteriormente son clonados permitiendo la elaboración de cultivos transgénicos (modificados genéticamente). Esto ha brindado beneficios en cuanto a la facilidad en la labranza de los cultivos brindando un mayor rendimiento de producción. Ya que en Guatemala es utilizado este herbicida desde hace varios años, se supone y espera que las bacterias que viven en la tierra de los cultivos presenten una tolerancia al herbicida. Esto se debe a cambios genéticos seleccionados en los microorganismos debido a la exposición continua al herbicida.

Este estudio inició con el establecimiento de protocolos para evaluar la tolerancia al glifosato de muestras bacteriales y el establecimiento de curvas de crecimiento bacteriano de muestras control de laboratorio (Nuñez, O. 2010). Siguió con la recolección de varias muestras de suelos en campos agrícolas de donde se aislaron y seleccionaron bacterias tolerantes al glifosato siguiendo un protocolo de aislamiento y selección vía sembrado superficial en agar nutritivo con distintas concentraciones del herbicida glifosato.

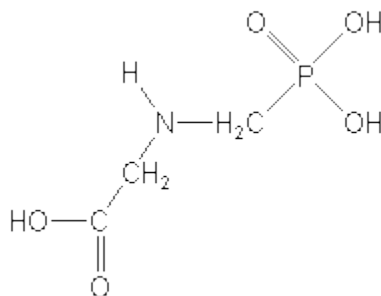
Posteriormente se analizaron todas las muestras para determinar el grado de tolerancia al herbicida en comparación con las cepas control. En las muestras bacteriales que presentaron tolerancia, es probable que entre los genes responsables se encuentre la 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), enzima responsable de la formación de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. Algunos microorganismos que presentan resistencia a este herbicida, tienen mutaciones en los genes de EPSPS. Las bacterias que crecieron en la mayor concentración fueron sembradas en cajas Petri nuevas a esa misma concentración de herbicida para confirmar su tolerancia al herbicida y aislar colonias únicas. Estas colonias se caracterizaron fenotípicamente en cuanto a su tolerancia al herbicida en placa, morfológicamente vía tinción gram y observación microscópica. También se identificaron genéticamente por medio de una secuenciación de ADN codificante del ARN ribosomal 16S. Finalmente se postulan a cinco aislados bacterianos como candidatos para realizar la clonación y el estudio del gen.

B. Glifosato

El glifosato (N-fosfometilglicina, $C_3H_8NO_5P$), es un herbicida sistémico que actúa en post-emergencia, no selectivo, de amplio espectro, usado para matar plantas no deseadas como pastos anuales y perennes, hierbas de hoja ancha y especies leñosas (Nivia E, 2006). Se vende por su nombre comercial como ROUNDUP®. El herbicida al ser aplicado a las malezas, éste se absorbe por hojas y tallos verdes, y es translocado hacia las raíces y órganos vegetativos subterráneos. Esto ocasiona la muerte de las malezas emergidas. Se lleva a cabo por un proceso lento, sobre todo en especies perennes (DuPont Agro, 2011).

A continuación se muestra la molécula de glifosato.

Figura 1. Estructura de la molécula de glifosato.



Se considera al glifosato como un herbicida que se adsorbe (une) fuertemente a los suelos, por lo que a pesar de ser soluble, tiene reducida movilidad. Esto se vincula a las propiedades de este herbicida. Cuando una sustancia tiene alta adsorción en el suelo, tiene reducida movilidad. El glifosato se considera una sustancia casi inmóvil en el suelo, expresado por el valor Koc (Dirección de Asuntos Jurídicos, Universidad del Litoral; 2010).

$$K_{OC} = \frac{\text{Cantidad de producto adsorbido en el C del suelo}}{\text{cantidad disponible en el agua}}$$

En el caso del glifosato el valor es 21000 ml/g. Es decir que la mayor proporción de herbicida está unida a las partículas sólidas. La persistencia del glifosato según la PPDB (Pesticide Properties Database) es de DT₅₀ a campo: 12 días, DT₅₀ en laboratorio a 20°C: 49 días. Se define DT₅₀ como la cantidad de días para que un plaguicida se reduzca a la mitad de concentración inicial. Estudios en Brasil observaron que la vida media (DT₅₀) del Glifosato varió entre 2 y 3,5 meses para suelos con 4 aplicaciones respectivas (Universidad del Litoral, 2010).

Roundup se utiliza generalmente como herbicida, pero puede ser usado como madurante en caña. La maduración de la caña se caracteriza de diferentes puntos de vista; botánico, fisiológico y agroindustrial. Botánicamente es en el momento en que esta es capaz de producir otra planta. Fisiológicamente es el proceso continuo de síntesis de azúcares y su almacenamiento. La mayor acumulación de sacarosa ocurre cuando la planta se encuentra en situaciones de estrés, como deficiencia hídrica, temperaturas bajas que restringen su crecimiento. Una maduración agroindustrial, la planta se considera madura a partir del momento en que el cultivo presenta mayor cantidad de azúcar, posibilitando mayor rendimiento industrial y dando resultados económicamente satisfactorios. En el desenvolvimiento del cultivo, este manifiesta sus características genéticas en función de condiciones ambientales (temperatura, radiación solar, precipitación, humedad y fertilidad del suelo), proporcionando períodos de crecimiento y maduración conforme a la combinación de esos factores (Mutton, M. *et al.* 2010). Existen dos tipos de madurantes

en agricultura; los inhibidores de crecimiento y los retardantes de crecimiento. El glifosato es entra en el grupo de los inhibidores de crecimiento. Este lo que hace es inhibir la biosíntesis de lípidos. Este se aplica de 30 – 40 días antes de la cosecha. Después de este tiempo transcurrido la caña debe ser cortada y en ese momento ha aumentado su nivel de sacarosa sin aumentar de tamaño (Almeida, M. 2010). En Anexo 1 se muestra un diagrama del modo de acción del glifosato. Los incrementos en azúcar recuperables se comienzan a detectar dos semanas después de la aplicación, obteniendo una respuesta más consistente después de seis semanas (Arcila J., Villegas F., 1995). Estudios realizados en la aplicación del glifosato en plantas de caña de azúcar, han encontrado un rendimiento significativo en el área industrial de los 15 a 30 días después de la aplicación y aumento en un 14 – 16% el nivel de sacarosa en el cultivo, también se notaron mejoras en la pureza, humedad y fibra de la caña (Subiros J, 2003). También se han realizado estudios en cultivos de arroz. Analizando el gen tolerante encontrado en cepas bacteriales de *Escherichia coli*, seguido de estudios de transformación, donde si se logró una buena transformación genética (Zhou M, *et al.*, 2006).

C. Acción del Glifosato

La enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) cataliza la transferencia reversible del enolpiruvato del fosfoenolpiruvato al grupo 5-hydroxy del shikimato-3-fosfato. El producto, 5-enolpyruvyl-shikimato-3-fosfato (EPSP) es un intermediario de la vía biosintética de aminoácidos aromáticos y compuestos aromáticos relacionados. El glifosato es el único herbicida que actúa inhibiendo la enzima EPSPS, localizada en el cloroplasto, perteneciente a la ruta del ácido siquímico (shikimato) lo que produce elevadas acumulaciones de ácido siquímico y sus derivados. (Bozzo, M. 2010).

La inhibición de la enzima EPSPS, impide la síntesis del ácido corísmico (corismato) el cual se requiere para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano). La ruta del shikimato es un proceso que solo ocurre en plantas, bacterias y hongos y no existe en animales, por lo que la toxicidad aguda en animales es baja. Dicha ruta es ubicua en los microorganismos, varios de los cuales

juegan roles importantes en el ciclo de los nutrientes. El Glifosato actúa inhibiendo esta ruta metabólica haciendo que no se produzcan los aminoácidos aromáticos. Existen cultivos modificados al los cuales el herbicida no les afecta. Un ejemplo es la soja transgénica que fue creada por una integración estable de un transgén de *Agrobacterium* spp. Este codifica la enzima EPSPS tolerante, haciendo que se mantengan niveles normales de aminoácidos aromáticos en la planta, ya que el herbicida actúa inhibiendo la biosíntesis de estos aminoácidos (Bozzo, M. 2010).

D. Tolerancia a herbicida.

Desde hace muchos años, se han realizado estudios donde se han identificado cepas bacterianas, que contienen un gen que les confiere tolerancia al herbicida glifosato. Se han llevado a cabo clonaciones genéticas y estudios del gen, donde más adelante se transfiere el gen bacterial a una planta y se realizan estudios sobre su efectividad en plantas (Stalker D, Hiatt W, Comai L, 1985; Ming HE, Yan-Fang NIE, Peilin X, 2003). También han realizado estudios desde hace varios años en microorganismos que presentan tolerancia a este herbicida. En bacterias entéricas la enzima es codificada por la región denominada *aroA* (Bozzo, M. 2010). Preparaciones de la enzima EPSPS de fuentes de bacterias y plantas han mostrado una inhibición al ser expuestos al herbicida glifosato. Aislamiento de etilmetanosulfonato produce una mutación en el gen *aroA* en una cepa de *Salmonella typhimurium*, confiriendo tolerancia al herbicida. El gen mutante fue clonado en *Escherichia coli* confiriendo tolerancia a glifosato. Al comparar la secuencia del gen *aroA* mutante (tolerante) y la cepa salvaje, reveló un cambio en un par de bases del gen. Este simple cambio es el responsable de la tolerancia. El cambio se encuentra en la posición del nucleótidos 1703 cambiando de una Prolina a una Serina en el marco abierto de lectura (Stalker D, *et. al.*, 1984).

El uso de herbicidas en los cultivos de producción agrícola, contribuyen a disminuir los daños causados por otros cultivos no deseados, así como la competencia de las malezas. Al eliminar los cultivos no deseados, se proporciona un ambiente óptimo para crecimiento de las plantas donde podrán encontrar mayor cantidad de nutrientes.

Sin embargo, los herbicidas no se pueden aplicar directamente a las áreas cultivadas sin riesgo de afectar el cultivo a cosechar. Los cultivos tolerantes a herbicidas ofrecen la ventaja de tolerar y sobrevivir aplicaciones directas de herbicidas, mientras que las malezas no sobreviven, resultando en poco o no arado. El uso de herbicidas, fertilizantes, variedades transgénicas, han modificado los sistemas de labranza en los últimos años con el fin de mantener los suelos cubiertos con residuos vegetales durante la siembra y crecimiento de las especies cultivadas, y así reducir la erosión causada por el viento y el agua (Satorre E, 2005)

Existe una comercialización a nivel mundial de cultivos transgénicos, iniciando desde 1996. Los países donde siembran cultivos transgénicos a más de 1 millón de hectáreas actualmente son USA (66.8 millones de hectáreas), Brasil (25.4), Argentina (22.9), India (9.4), Canadá (8.8), China (3.5), Paraguay (2.6), Pakistán (2.4), Suráfrica (2.2) y Uruguay (1.1 millones de hectáreas). La siembra de cultivos transgénicos ha aumentado drásticamente en los últimos años (James C, 2010).

Desde el inicio de la comercialización de cultivos transgénicos en 1996, la tolerancia a herbicida ha sido el rasgo dominante. México, considerado centro de la diversidad del maíz, fue el primero en realizar exitosamente las pruebas de campo de maíz tolerante a herbicida. En el 2010, la tolerancia a herbicida se implementó en cultivos de soja, maíz, canola, algodón, remolacha azucarera y alfalfa, ocupan el 66% u 89.3 millones de hectáreas del área de cultivos biotecnológicos a nivel mundial de 148 millones de hectáreas (James, C. 2010). El gen introducido a estos cultivos ha sido patentado y comercializado por la empresa Monsanto. Esta es una empresa agrícola que aplica innovación y tecnología para ayudar al agricultor a producir más y más conservado, y al mismo tiempo reducir el impacto de la agricultura en el medio ambiente (Invest in Guatemala, 2009).

La agricultura convencional de siembra de cultivos modificados genéticamente, ha tenido implicaciones significativas en el medio ambiente. Esto incluye la reducción del uso de pesticidas/herbicidas, decrecimiento en la emisión de CO₂ y la conservación de la

humedad del suelo por la optimización de la siembra directa a través de la aplicación de la tolerancia a herbicidas. Los cultivos resistentes a herbicidas disminuyen o eliminan el uso de arado en los cultivos lo cual conlleva a la conservación de agua (James, C, 2010).

E. Modo de empleo

En Guatemala el glifosato es ampliamente utilizado como herbicida y como madurante, en especial el sector azucarero utiliza el glifosato madurante. Utilizan el vendido comercialmente como RoundUP Ready 35,6 SL. Se aplica de distintas formas y en distintas concentraciones dependiendo de su uso. Si lo utilizan para matar malezas en cultivos como tomate, aguacate, piña, etc. no es aplicado directamente en el cultivo.

Éste se aplica antes de la siembra y en algunos casos cuando el cultivo ya está sembrado en los alrededores. Esto es aplicado utilizando bombas de fumigación agrícola por una persona. Cuando se utiliza como madurante en caña la aplicación la dividen en tres períodos. Esto se basa en el período de zafra. Se aplica de 5-6 L de glifosato / hectárea (HA) / 200L de agua. Esto equivale, utilizando 5L de glifosato, a una concentración de $[3.56 \times 10^5 \text{ g/L/Ha}] \alpha [50\text{mM/Ha}]$. Y al utilizar 6L de glifosato, a una concentración de $[10.68 \text{ g/L/Ha}] \alpha [60\text{mM/Ha}]$ (Entrevista: Ing. Gerardo Espinoza, Ing. Mario Melgar. Cengicaña 2011).

Al utilizarlo como madurante se divide en tres períodos. El primer período es del 15 de noviembre – 15 de enero; aplican 1.5L de glifosato / 6-8 gal de agua / Ha. Esto equivale a una concentración de $[20.18 \text{ g/L/Ha}] \alpha [120\text{mM/Ha}]$. En el segundo período de 15 enero – 15 marzo; aplican 1L de glifosato / 6-8 gal de agua / Ha. Esto equivale a $[13.46 \text{ g/L/Ha}] \alpha [80\text{mM/Ha}]$. Y el tercer período de 15 marzo – 15 mayo; aplican 0.8L de glifosato / 6-8 gal de agua / Ha. Esto equivale a una concentración de $[1.08 \text{ g/L/Ha}] \alpha [64\text{mM/Ha}]$. En este caso la aplicación es vía aérea. A la mezcla de glifosato suelen agregarle adherentes o aceites con el fin que la gota no se evapore en el aire y que esta sea más pesada. También para que al llegar a la hoja esta ocupe una mayor cantidad de área para ser absorbida (Entrevista: Ing. Gerardo Espinoza, Cengicaña. Ing. Sergio Calderón, Ingenio Magdalena 2011). Guatemala es el quinto país exportador de azúcar a

nivel mundial, el segundo en Latinoamérica y el segundo lugar en productividad (toneladas métricas de azúcar/Ha) a nivel mundial. El azúcar es el segundo producto agrícola en Guatemala en generación de divisas constituyéndose en una importante contribución a la economía nacional (Entrevista Ing. Mario Melgar, Ingenio Magdalena). Por lo que en Guatemala el aislar bacterias nativas que están en el suelo de campos agrícolas tratados con glifosato, permitirá identificar si existe un gen libre de patente que confiere tolerancia al mismo.

F. Estudio de investigación

Se inició el estudio realizando curvas de referencia utilizando dos cepas de laboratorio como referencia, *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli XLI-blue*, ya que estas son bacterias que pueden estar presentes en las muestras de suelo de los cultivos donde se toman las muestras. Se hicieron curvas repetidas de las muestras igual que los controles para así obtener una base estadística sólida. Las cinco muestras bacteriales obtenidas con una tolerancia específica al glifosato fueron postuladas para continuar en el proceso de clonación y verificación de la presencia de un gen que confiera tolerancia.

Estas cinco muestras bacteriales fueron caracterizadas por medio de una secuenciación genética del ARNr (ARN ribosomal) 16S. Una secuenciación genética es una sucesión de letras representando la estructura primaria de una molécula de ADN, con la capacidad de transportar información. Los genes que codifican el ARN ribosomal están entre los más estable e inmutables genes conocidos. La comparación de las secuencias de los ARNr 16S permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos vivos tan diversos como bacterias, hongos y humanos. Porciones de la secuencia del ARNr de organismos distintos, pero relacionados es similar. Esto significa que secuencias de organismos distintos pero relacionados entre sí se puede alinear con precisión permitiendo la fácil medición entre sus diferencias. Por esto es que la secuenciación genética de los genes del ARNr 16S, se ha convertido en el patrón de referencia para establecer taxonomía, filogenia (relaciones evolutivas) y rangos de divergencia entre especies bacterianas (Boye, et al., 2007). Este es un polirribonucleótido

de aproximadamente 1,500 nucleótidos (nt) codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S. En su secuencia existen porciones conservadas y otras variables y específicas de cada especie (Instituto Valenciano de Microbiología, 2005). Esta secuencia tiene regiones hipervariables las cuales divergieron con el tiempo. Estas regiones suelen estar flanqueadas por regiones altamente conservadas. Los cebadores utilizados se unen a las regiones conservadas amplificando las variables (Boye, *et al.*, 2007). Como cualquier cadena de nucleótidos de cadena sencilla, este se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla. En eucariotas el ARN 18S es la macromolécula equivalente. Estas subunidades ARNr 16S y 18S proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas. Las regiones en el ADN del ARNr son altamente conservadas presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contiene variaciones que se concentran en regiones específicas (Rodicio MR, *et al.*, 2004).

Al iniciar el estudio se realizó una búsqueda exhaustiva del tema. Al mismo tiempo se contó con el apoyo de la Dra. Mónica Stein, junto con el de la finca de piña de Agropecuaria Popoyán. También se contó con el apoyo del Centro de Estudios en Biotecnología y el departamento de Bioquímica y Microbiología. La secuenciación genética se llevo a cabo en el Laboratorio BIOLAB, Guatemala. La cual pude realizar yo misma con ayuda de Gabriela Penados Richter encargada del área de Biología Molecular BIOLAB.

II. JUSTIFICACIÓN

La identificación de tolerancia bacterial al herbicida glifosato y su transferencia a cultivos económicamente importantes por medio de ingeniería genética ha brindado beneficios agrícolas en cuanto a la facilidad en la labranza y ahorro de insumos, brindando un mayor rendimiento de producción. Estos rasgos aislados y cultivos comercializados son sujetos a patentes, y por ende no accesibles a todos los agricultores. Ya que en Guatemala es utilizado este herbicida desde hace varios años, se supone y espera que existan bacterias de suelo que presenten una tolerancia al herbicida y de donde se puedan aislar genes responsables de la tolerancia.

Identificar bacterias locales tolerantes al glifosato e intentar aislar el material genético responsable representa un primer paso para contar en el país con genes de tolerancia al glifosato libres de patente y accesibles para la generación de cultivos genéticamente modificados adecuados para las necesidades locales.

III. OBJETIVOS

A. General

Aislar y caracterizar bacterias tolerantes al herbicida glifosato de muestras de suelos provenientes de campos agrícolas sometidos al herbicida, para postular bacterias candidatas para el estudio y clonación del gen que confiere la tolerancia.

B. Específicos

1. Determinar la tolerancia al glifosato de cepas de laboratorio para establecer concentraciones de glifosato de referencia.
2. Aislar bacterias de muestras de suelo expuestas al herbicida glifosato, que sean potencialmente tolerantes al herbicida.
3. Caracterizar las bacterias con mayor tolerancia al herbicida por medio de técnicas fenotípicas y moleculares, para postularlas como bacterias candidatas para el estudio y clonación del gen que confiere la tolerancia.

IV. MÉTODOS

A. Procedimiento

1. Realización de curvas de crecimiento con cepas de laboratorio como control.

Se optimizaron curvas de crecimiento de dos cepas de laboratorio: *Escherichia coli* *XL1-blue* y *Agrobacterium tumefaciens*. Se realizaron curvas en triplicado para cada una. Las bacterias se sembraron en cajas petri con 25 mL de agar nutritivo de manera de obtener colonias aisladas. Se inoculó una sola colonia en un tubo con tapadera de rosca conteniendo 3 mL de caldo nutritivo dejándolo toda la noche en incubación a 37°C en movimiento constante a 25 rpm con la tapadera no cerrada en su totalidad. Al siguiente día, de ese tubo que se tornó en color turbio, se obtuvieron 5 µL del caldo y se volvió a sembrar en un nuevo tubo con 3 mL de caldo nutritivo nuevamente, este se dejó en incubación con agitación constante a 25 rpm durante el tiempo necesario para poder medir la densidad óptica (OD) a una longitud de onda de 600nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS. Cuando el valor de absorbancia era 0.01^a se continuó con la siembra en caja nuevamente. Para esto se realizó una dilución 1/100 (utilizando más caldo nutritivo) del caldo que daba absorbancia 0.01A y de esta dilución se sembraron 5 µL superficialmente en cada caja petri de plástico que contenían 25 mL de agar nutritivo y a concentraciones de glifosato de 0, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 100 mM. Para sembrar se utilizaron de 5 a 7 perlitas de ebullición estériles por cada caja, en grupos de 3 cajas y con ayuda de una pinza estéril para colocar las perlas dentro de las cajas. Estas se tapaban y se colocaban en una pequeña torre y se movían en todas direcciones durante aproximadamente 40 segundos haciendo un leve movimiento rotacional cada 5 segundos de manera de sembrar en toda la superficie y no solo en los bordes del medio. Las perlas se retiraban con la misma pinza y se colocaban dentro de un beaker de descarte. Al finalizar la siembra, todas las cajas se colocaban dentro de la incubadora a 30° C durante 48 horas, para luego de 48 horas contar las colonias. (Pommerville, 2007) Ver Anexo 2. Preparación de medios de cultivo y 2. Realización inóculos bacterianos.

2. Recolección de la muestra. Las muestras fueron recolectadas de la finca de piña de Agropecuaria Popoyán ubicada en el km 101 carretera a Mazatenango. El sector azucarero se encuentra en la costa sur de Guatemala aproximadamente a una temperatura de 38-42 °C. El estudio se llevó a cabo junto con la Dra. Mónica Stein como directora del mismo y con la ayuda de Nohemy Zelada como técnica de laboratorio. Se tomaron muestras en triplicado de cuatro distintos puntos de la finca de la superficie de la tierra de los cultivos, utilizando botes de plástico tapados con papel secante húmedo. Estas se llevaron al laboratorio de microbiología de la UVG ese mismo día en condiciones adecuadas (dentro de una hielera a baja temperatura) y almacenadas ese día en lugar seco unas horas a temperatura ambiente (Nuñez O, curso microbiología aplicada 2010). Ver Anexo 4. Recolección de muestras y datos de campo.

3. Procesamiento de muestras de tierra. Se resuspendió 1 gramo de la muestra de tierra en 10 mL de agua destilada estéril en un tubo con tapadera de rosca que luego se sometió al vortex durante 1 minuto. Estas suspensiones de tierra se dejaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se realizó una dilución de 1/10. De esta 0.1 mL se agregó sobre los medios de cultivo de agar nutritivo suplementado con distintas concentraciones de glifosato (0, 25, 50, 75, 100 mM) y con ayuda de un esparcidor se cubrió la caja Petri entera de modo de obtener colonias no tan agrupadas. Las placas se incubaron durante 3-4 días a una temperatura de 30°C (Pommerville, 2007).

4. Tamizaje. De todas las muestras, las que tuvieron un crecimiento más alto, se sembraron en un nuevo agar nutritivo a esa misma concentración de glifosato de manera a obtener colonias aisladas. Se observó minuciosamente que todas las colonias tuviesen las mismas características fenotípicas y para evitar cualquier duda se realizó una tinción Gram. En los casos de haber dos colonias distintas en la misma caja, se sembraban cada una en una caja individual. Éstas se incubaron a 30°C de 3-4 días. A las muestras seleccionadas se les realizó una curva de referencia en cajas petri con agar

nutritivo a distintas concentraciones de glifosato de [25, 50, 75, 90, 100 mM]. Las bacterias que crecieron en este ambiente con herbicida a mayor concentración, fueron las escogidas para los análisis posteriores.

5. Curvas de crecimiento en medio líquido y sólido de las muestras. Se inició haciendo curvas repetidamente con las bacterias control para tener un punto de comparación. Se siguió el mismo procedimiento inicial de las curvas de crecimiento con cepas de laboratorio. De esta manera se pudieron comparar los resultados de cantidad de colonias obtenidas entre los grupos siguiendo todos los mismos pasos y bajo las mismas condiciones. Las repeticiones se realizaron en distintos días para obtener réplicas biológicas, no técnicas, del procedimiento.

6. Caracterización fenotípica. Las bacterias se caracterizaron con base a su morfología y coloración gram, utilizando la técnica de tinción de Gram. Ver Anexo 5 para el procedimiento de la tinción.

7. Caracterización molecular. Por último se llevó a cabo el análisis de secuenciación genética en el Laboratorio BIOLAB, Guatemala. Se utilizó el kit MicroSeq® 500 16S rDNA Sequencing Kit de Applied Biosystems con sus software respectivo. Las muestras fueron llevadas en cajas individuales re sembradas en agar nutritivo sin glifosato de manera a obtener colonias aisladas.

a. Extracción de ADN: Las muestras se proporcionaron en caja petri por lo que se seleccionó una pequeña colonia aislada utilizando un aza en argolla desechable. Se resuspendieron las células en 100 μ L de reactivo de extracción “PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent”. Se colocaron los tubos en vortex durante 30 segundos y luego se calentaron a 100 °C (>97 °C) durante 10 minutos. Luego se centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 minutos. Finalmente se trasladan 50 μ L del sobrenadante a un tubo nuevo. Se utilizó una solución de PrepMan Ultra Sample preparation Reagent la cual provee una forma simple de extraer el ADN de distintos tipos de muestras, tales como, bacterias, hongos, tejido, pelo, etc. Con ayuda del calor a 100°C y el movimiento en el vortex las células lograron lisarse completamente

b. Dilución de la muestra: Se realizó una dilución 1/100 agregando 495 μL de agua libre de ADN y 5 μL de la muestra post extracción.

c. Amplificación de ADN: Se utilizó el reactivo MicroSeq® 500 16S rDNA PCR Kit. Se contó con siete tubos, uno para cada muestra, un control positivo (*E.coli* DNA 1ng/ μL) y un control negativo (Agua libre de ADN). A cada tubo se le agregó 15 μL de Master Mix; MicroSeq 500, rDNA PCR Kit. Luego 15 μL de muestra ya diluida 1/100 post extracción y 15 μL de control positivo y 15 μL de control negativo. Se colocó en el termociclador ABI PCR 2720 – PROGRAMA MicroSeq 500. Se amplificó el ADN con la enzima polimerasa AmpliTaq Gold ® DNA Polymerase. Se llevaron a cabo 30 ciclos en 80 minutos. El kit utilizado MicroSeq® 500 16S rDNA PCR Kit, contiene las soluciones necesarias) master mix ya listo para utilizar utilizando como ADN polimerasa AmpliTaq Gold®. El control positivo del kit fue ADN de *E.coli* y Agua como control negativo), para secuenciar las primeras 500 pares de bases del gen que codifica al ARN ribosomal bacterial, 16S.

d. Purificación de la amplificación (producto de PCR) con ExoSap It: En un tubo para cada muestra se agregaron 5 μL de enzima ExoSap It y 12.5 μL de muestra amplificada. Se colocaron los tubos en termociclador ABI 2720- ExoSap durante 30 minutos. La solución de ExoSap-it es una exonucleasa tipo I recombinante. Es utilizado para purificar productos de PCR.

Los separa en un rango de tamaño desde menos de 100 pb hasta 20 kb, sin pérdida de muestra y removiendo cebadores no utilizados y nucleótidos

e. Reacción de secuenciación: En dos tubos se agregaron 7 μL a cada uno de producto de PCR (muestra amplificada y purificada). A un tubo se le agregaron 13 μL de Reactivo Forward y al otro tubo 13 μL del Reactivo Reverse. Se colocaron las muestras en el termociclador ABI 2720, siguiendo el protocolo MicroSeq – Secuenciación.

f. Purificación de secuenciación: Las muestras fueron purificadas utilizando una columna marca EDGE BIO. Se utilizaron dos columnas por muestra (una para forward y una reverse). Inicialmente las columnas se centrifugaron a 4,000 rpm durante 2 minutos para eliminar el buffer inicial. Luego la columna se cambió a un tubo nuevo y a cada una

se le agregaron 20 μL de su muestra respectiva con cuidado de no tocar la columna con la punta ni depositando la muestra en rajaduras ni en las paredes del tubo. Luego se centrifugaron a 4,000 rpm durante 2 minutos nuevamente. Finalmente la columna se descartó.




Las columnas EDGE BIO son filtros de gel “Performa DTR (Dye Terminator Removial) Gel Filtration Cartidges. Está compuesto de un gel especial diseñado para eliminar moléculas de bajo peso molecular como dye terminators (terminaciones de marcadores cre), dNTPs y otros materiales de la reacción de secuenciación. También remueven oligonucleótidos de fragmentos de hasta 15 pb, amortiguadores y nucleótidos marcados con biotina, isótopos y otros marcadores. Las columnas vienen pre empacadas con la matriz hidratada llena de agua. Por eso es que al inicio se debieron de centrifugar.

g. Secuenciación 3130: Se trasladaron las muestras ya filtradas a una placa nueva se secuenciación. Se llevó a cabo utilizando un Secuenciador Genético serie 3130, de Applied Biosystems. Con columna de 36 cm y el polímero líquido POP7. Utilizando el programa de secuenciación 3130 se analizaron las muestras en el equipo en un periodo de 6 horas.

Se utilizó una columna de 36 cm con POP 7 como polímero para la migración de los iones. Este es el polímero más reciente fabricado especialmente para el equipo de análisis de ADN de Applied Biosystems modelo 3130. Se ha demostrado que combina la medición de fragmentos de ADN largos en tiempo cortos.

h. Resultados de secuenciación: La calidad del análisis es analizado por el equipo de la siguiente manera:

QC Report Legend

Successful Analysis  Quality Alert  Failed Analysis 

QC Report Results

Se dan los resultados del nombre del espécimen en la biblioteca genómica con el número ATCC. Seguido del porcentaje de emparejamiento que existe entre la secuencia de la muestra y la de la biblioteca, el cual se compara con la cantidad de desajustes obtenidos. También se ven los resultados del tamaño de la secuencia de consenso y de la región de la biblioteca. Y finalmente se observa el árbol filogenéticos del espécimen. Da un resultado de cinco posibles especímenes iniciando desde el de mayor probabilidad al menor.

Los resultados de la secuencia genética de cada muestra fueron comparados y analizados en el banco de secuencias genéticas de NCBI/BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se realizó el análisis con el fin de confirmar el resultado de la secuenciación genética.

B. Análisis estadístico

Las curvas realizadas se hicieron en triplicado con el fin de calcular la desviación estándar, para determinar la reproducibilidad del fenotipo. Junto se llevó a cabo un análisis de Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Este método es considerado como un estándar para determinar la susceptibilidad de organismos ante distintos agentes, como antimicrobianos, pesticidas, insecticidas, etc. Es una técnica utilizada en laboratorios de diagnóstico para confirmar tolerancias, para dar resultados exactos cuando se tienen inexactos de otros laboratorios. En este estudio se determinó la concentración mínima inhibitoria de los controles utilizados para luego ser comparados con las bacterias obtenidas de las muestras de tierra. Esta comparación indicó si las bacterias aisladas presentaron un MIC mayor que los controles (Andrews J, 2001; Huanhuan W, 2008). El análisis de MIC se puede realizar de dos formas. Primero, cualitativamente, observando el crecimiento bacterial a distintas concentraciones de inhibidor, en este caso glifosato, para notar la primera concentración en la que no se observa crecimiento y tomando esa como la concentración mínima inhibitoria. Segundo, cuantitativamente, utilizando métodos estadísticos para realizar una regresión de los datos de crecimiento a distintas concentraciones inhibitorias e identificar el intercepto X como el MIC. Ambos métodos se utilizaron.

Para poder realizar esto y otros análisis estadísticos, se llevo a cabo un análisis de estimación de la supervivencia acumulada por el método de Kaplan-Meier. Este es un método no paramétrico y no supone una distribución normal. El análisis se llevó a cabo utilizando el programa SPSS (Statistical Package of the Social Sciences). Programa producido por IBM en EEUU. El método da un valor de significancia P, el cual al ser menor o igual a 0.05 nos dice que la muestra comparada con el control analizado, pertenecen a dos grupos distintos. Por el contrario si el valor es mayor a 0.05 indica que ambas muestras pertenecen al mismo grupo. También nos da un valor MIC calculado, de manera que calcula una regresión utilizando todos los puntos de concentración utilizados, y toma como MIC el valor donde cruza el eje x la pendiente.

V. RESULTADOS

A. Aislamiento de bacterias tolerantes al herbicida glifosato.

Doce muestras de tierra fueron recolectadas en la finca de piña de Agropecuaria Popoyán. Se dividieron en cuatro grupos de tres muestras cada grupo (grupo de muestras 1-2-3; 4-5-6; 7-8-9 y 10-11-12). Cada una de las muestras se sembró en caja petri individual según el procedimiento de procesamiento de muestras de tierra (Ver Materiales y Métodos).

Cuadro 1. Áreas de recolección de muestra de las bacterias de suelos sometidos al herbicida glifosato.

Muestra 1-2-3	Campos aledaños a la siembra de piña donde se aplica glifosato para controlar malezas alrededor de la siembra. Área inclinada y a media sombra. Esta área tuvo aplicación de glifosato el día de la recolección (22 de junio 2010) a las 6 am.
Muestra 4-5-6	Siembras de hule y aguacate (mixtas) donde se aplica glifosato para controlar malezas bajo los árboles. Área sombreada. Aplicación de glifosato viernes 29 de mayo (aproximadamente 3 semanas).
Muestra 7-8-9	Área que divide la siembra de aguacate de la siembra de piña. Se aplica glifosato para controlar malezas. Aplicación de glifosato viernes 29 de mayo (aproximadamente 3 semanas).
Muestra 10-11-12	Área divisoria entre dos plantaciones de piña. Se aplica glifosato para controlar la maleza entre siembras. Aplicación de glifosato 22 de mayo (aproximadamente 4 semanas).

Al observar a simple vista la morfología y características de las colonias que crecieron de las muestras de tierra, cada muestra mostró colonias características y muchas muy similares. Presentaron colonias de tamaño medio, color amarillo claro y algunas beige, brillantes, cóncavas y de borde liso. Sin embargo algunas de ellas presentaron dos tipos de colonias distintas en una misma caja. Todas se volvieron a sembrar en cajas con agar nutritivo y glifosato a una concentración de [50mM] de manera a obtener en una caja solamente colonias de un solo tipo. De esto los cuatro grupos iniciales cambiaron: grupo 1-2-3; grupo 4-5 (no 6 porque no hubo crecimiento); grupo 7-8A-8B-9A-9B; grupo 10-11-12A-12B. Todas las muestras sembradas en cajas a distintas concentraciones de glifosato dieron los siguientes resultados de crecimiento.

Cuadro 2. Resultados de crecimiento positivo o negativo de todas las muestras de suelo iniciales a distintas concentraciones de glifosato en incubación a 30°C durante 72 horas. Crecimiento (+), NO crecimiento (-).

Muestra	Glifosato 0 mM	Glifosato 25 mM	Glifosato 50 mM	Glifosato 75 mM	Glifosato 100 mM
1	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
2	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
3	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
4	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
5	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
7	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
8 A	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
8 B	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
9 A	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
9 B	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
10	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
11	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
12 A	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
12 B	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)

B. Caracterización fenotípica

De todas estas muestras se realizó una tinción de gram para tener una orientación de qué muestras eran con las que se estaba trabajando. Los resultados fueron los siguientes:

Cuadro 3. Resultado de Tinciones Gram de todas las muestras de tierra.

Muestra	Tinción Gram
1	Bacilos Gram negativo
2	Bacilos Gram negativo
3	Bacilos Gram negativo
4	Cocos Gram positivo
5	Cocos Gram positivo
7	Cocos Gram positivo
8 A	Cocos Gram positivo
8 B	Cocos Gram positivo
9 A	Bacilos Gram negativo
9 B	Bacilos Gram negativo
10	Bacilos Gram negativo
11	Cocos Gram positivo
12 A	Bacilos Gram negativo
12 B	Bacilos Gram negativo

Las muestras con el resultado de crecimiento a concentración de [75 mM] se volvieron a sembrar en nuevas concentraciones de [65, 75, 80, 90 y 100mM] siendo los mejores resultados los siguientes:

Cuadro 4. Muestras de mejor crecimiento bacteriano a concentraciones relativamente altas de glifosato, incubadas a 30°C durante 72 horas.

Muestra	Glifosato 75 mM	Glifosato 80 mM	Glifosato 90 mM
1	Crecimiento	NO Crecimiento	NO Crecimiento
2	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
3	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
7	Crecimiento	Crecimiento (poco)	NO Crecimiento
9 A	Crecimiento	Crecimiento (poco)	NO Crecimiento
9 B	Crecimiento	Crecimiento	NO Crecimiento

Estas cinco muestras fueron seleccionadas para realizar las curvas de crecimiento a distintas concentraciones de glifosato. También se les realizó nuevamente una tinción de Gram dando los siguientes resultados.

Cuadro 5. Caracterización fenotípica por medio de la técnica de Tinción de Gram.

Muestra	Característica
2	Bacilos Gram negativo
3	Bacilos Gram negativo
7	Cocos Gram negativo
9 A	Bacilos Gram negativo
9 B	Bacilos Gram negativo

C. Curvas de crecimiento

Se realizaron tres curvas de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de glifosato para cada una de estas muestras. Se inoculaban cuando el OD₆₀₀ que se media daba una absorbancia (A) de 0.01. A cada bacteria le llevaba un rango de tiempo distinto llegar a esa absorbancia. Los datos se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 6. Tiempo aproximado que demoraba cada bacteria en llegar a una absorbancia de 0.01 midiendo OD₆₀₀.

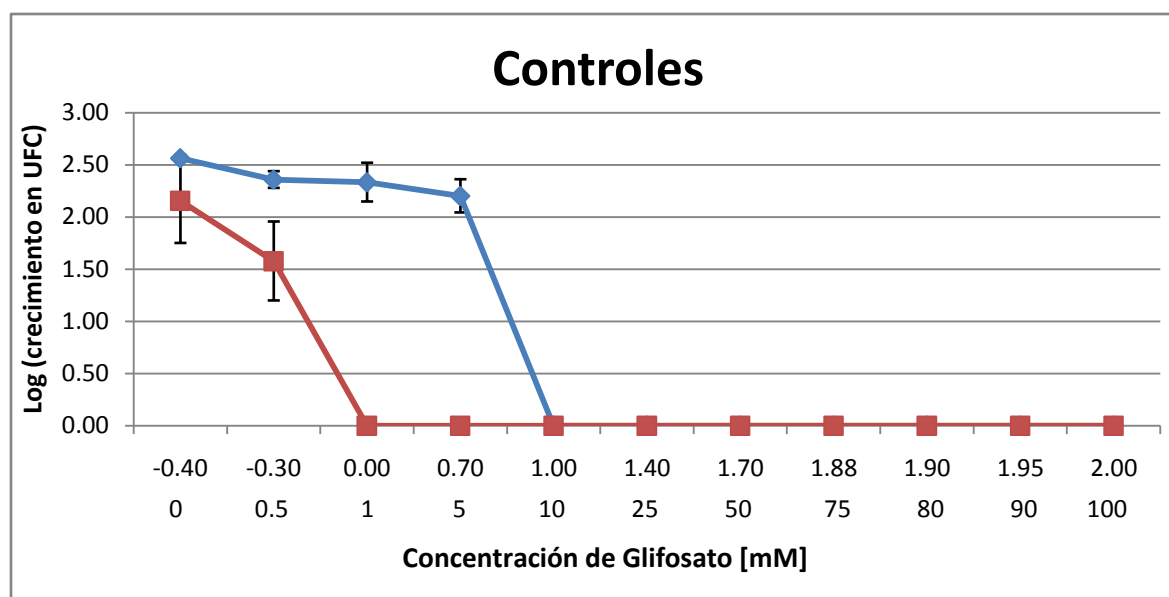
Muestra	Tiempo (minutos)
Control E. coli	45
Control A. tumefaciens	80
Muestra 2	55
Muestra 3	50
Muestra 7	5
Muestra 9 A	10
Muestra 9 B	15

* El OD se midió en el segundo tubo inoculado a partir del que se había dejado toda la noche. El tiempo variaba según la temperatura ambiental, pero era alrededor de estos datos.

D. Controles *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*

Las curvas de crecimiento bacterial de los controles se realizaron al mismo tiempo que las muestras, ya que el protocolo se optimizó a la vez que se realizó la caracterización. A continuación se muestran los promedios de las tres curvas de ambos controles. Las curvas están en escala logarítmica con el fin de mejor interpretación de resultados. También se muestran las respectivas barras de error obtenida de la desviación estándar de los resultados en escala logarítmica. Los resultados del conteo bacteriano y las curvas en escala no logarítmica se presentan en la sección de Anexos.

Figura 2. Promedio de tres curvas de crecimiento a distintas concentraciones de glifosato de los controles (azul) *Escherichia coli* y (rojo) *Agrobacterium tumefaciens* en escala logarítmica.



Todos los datos originales de los controles se encuentran en el Anexo 6.

Con el método de Kaplan-Meier se logró determinar el MIC de cada control. A continuación se muestran los resultados.

Cuadro 7. Valor de MIC calculado y observado de los controles E.coli y A.tumefaciens.

Muestra	MIC Calculado Concentración de Glifosato [mM]	MIC Observado Concentración de Glifosato [mM]
<i>Escherichia coli</i>	48	10
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35	1

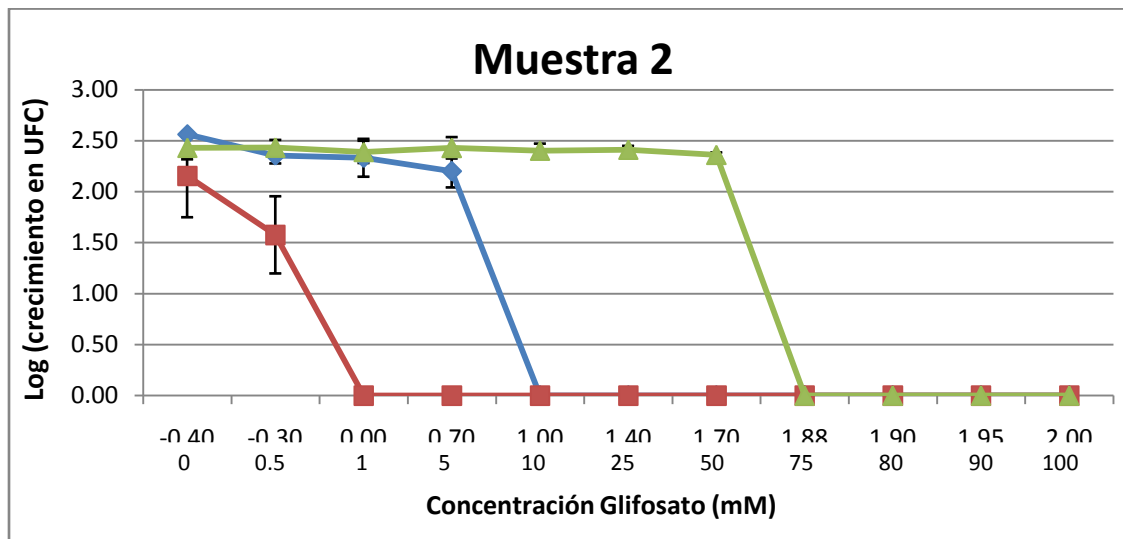
* El MIC calculado es el reportado por la estadística de supervivencia acumulada Kaplan Meier. El MIC observado es una estimación cualitativa.

E. Muestras

Las curvas de los controles fueron el punto de comparación con las cinco muestras seleccionadas. A continuación se muestran los promedios de las curvas realizadas en triplicado de cada muestra. También se muestran las barras de error de la desviación estándar de los resultados. Los datos se muestran en escala logarítmica. Al mismo tiempo se llevó a cabo un análisis estadístico utilizando el método de Kaplan-Meier. Así se logró determinar si las muestras y los controles pertenecían a un mismo grupo o no y si existe una diferencia significativa estadísticamente entre los controles y las muestras, utilizando el valor de significancia P. También se obtiene el resultado del MIC de cada muestra. Para calcular el MIC se obviaron las concentraciones de 90 y [100mM] ya que estas distorsionaban un poco los resultados y ninguna muestra creció a esa concentración.

Muestra 2

Figura 3. Gráfica del promedio de las curvas de crecimiento de la muestra 2 en escala logarítmica comparado con los controles. Control *E.coli* (Azul), control *A.tumefaciens* (rojo), Muestra 2 (verde).



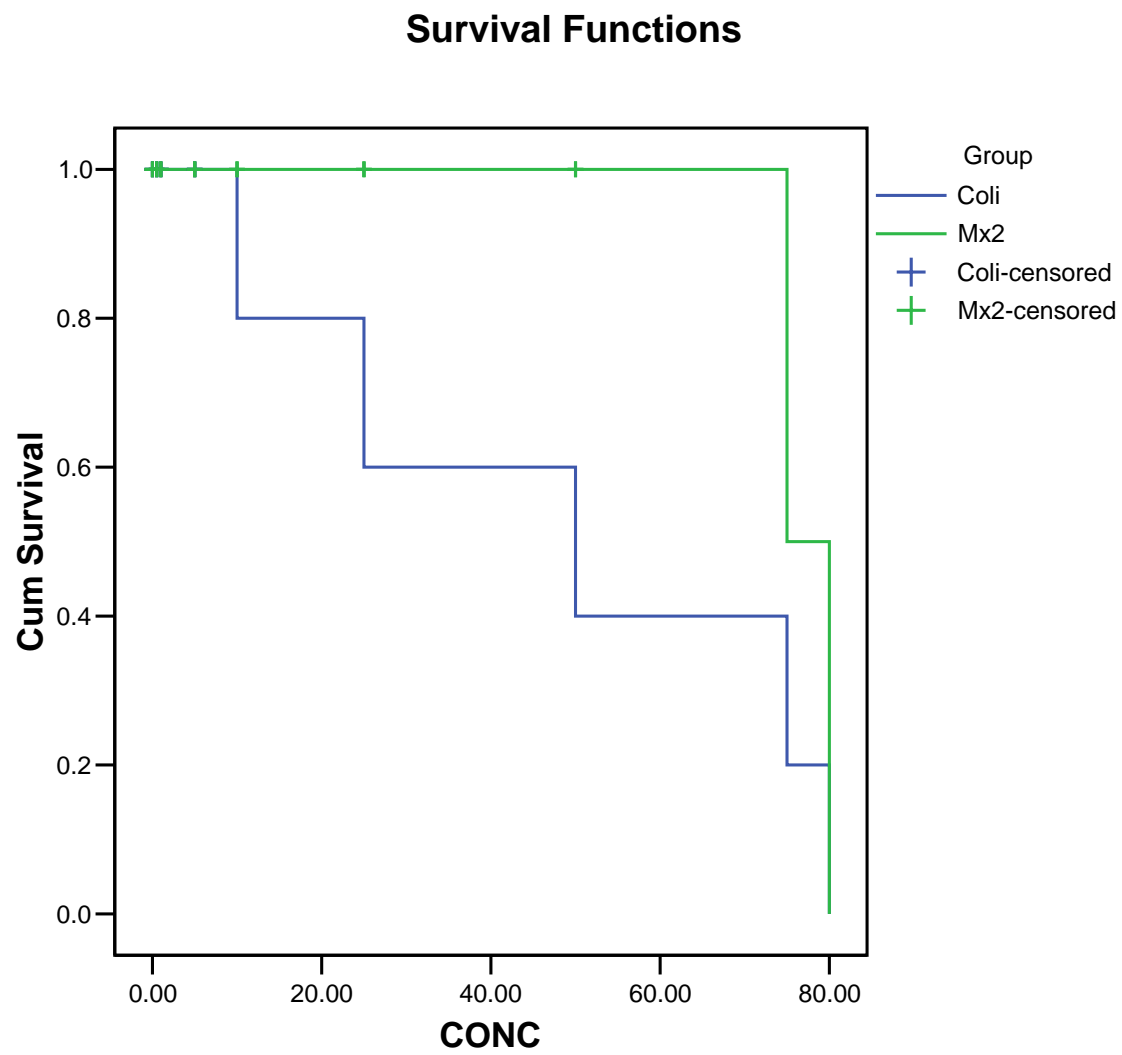
Todos los datos originales de la muestra 2 se encuentran en el Anexo 7.

Cuadro 8. Valor P y MIC de la muestra 2 analizado por el método de Kaplan-Meier.

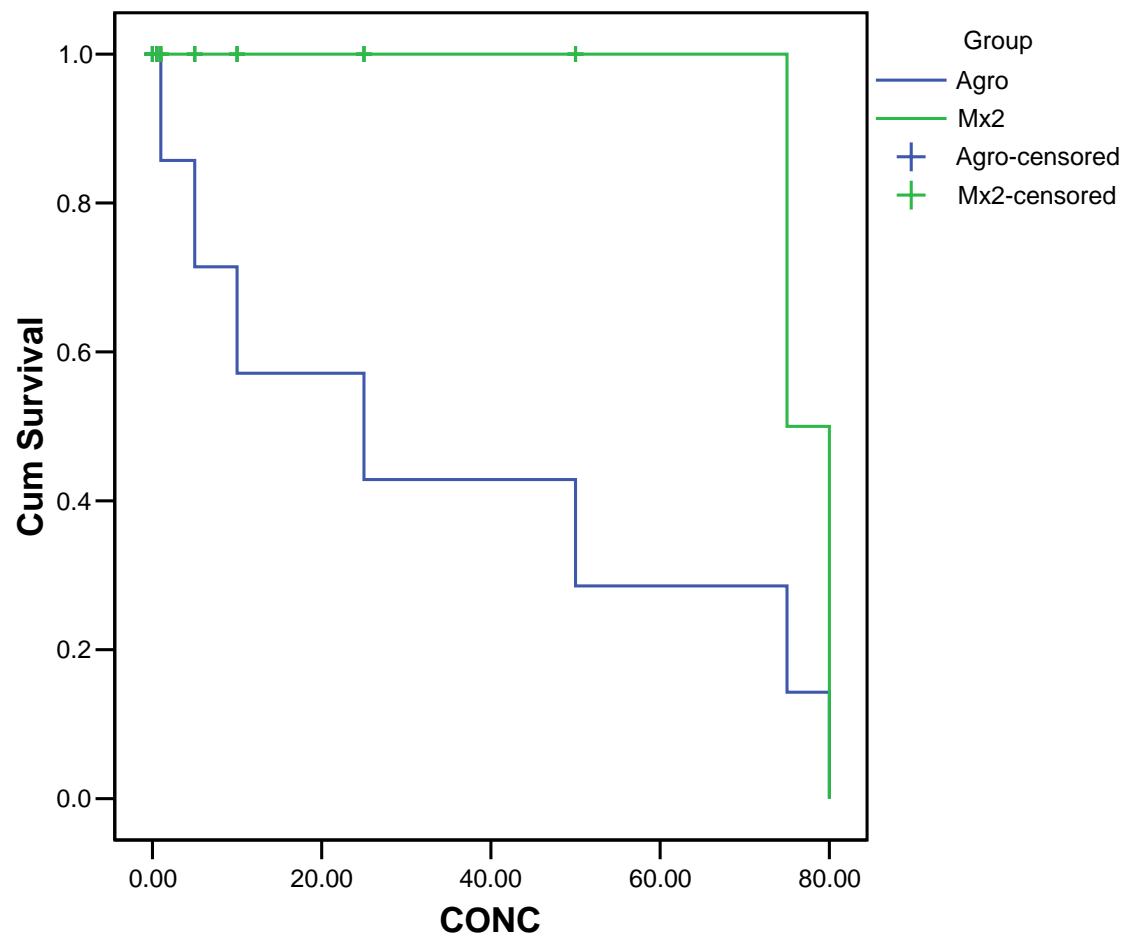
MIC Observado Concentración de Glifosato [mM]	MIC Calculado Concentración de Glifosato [mM]	Valor P comparado con <i>E.coli</i>	Valor P comparado con <i>A. tumefaciens</i>
75	77.50	0.0078	0.0003

Al mismo tiempo se obtuvo una gráfica del análisis de sobrevivencia acumulada calculada estadísticamente. Esta se muestra a continuación.

Figura 4. Gráficas de la función de sobrevivencia acumulada de la muestra 2 comparada con ambos controles.

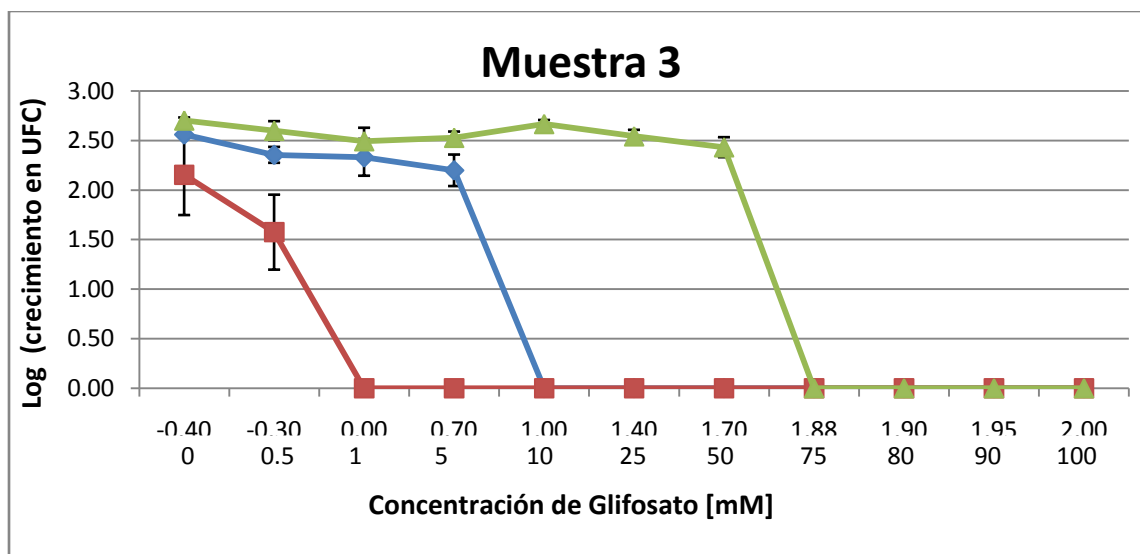


Survival Functions



Muestra 3

Figura 5. Gráfica del promedio de las curvas de crecimiento de la muestra 3 en escala logarítmica comparado con los controles. Control *E.coli* (Azul), control *A.tumefaciens* (rojo), muestra 3 (verde).

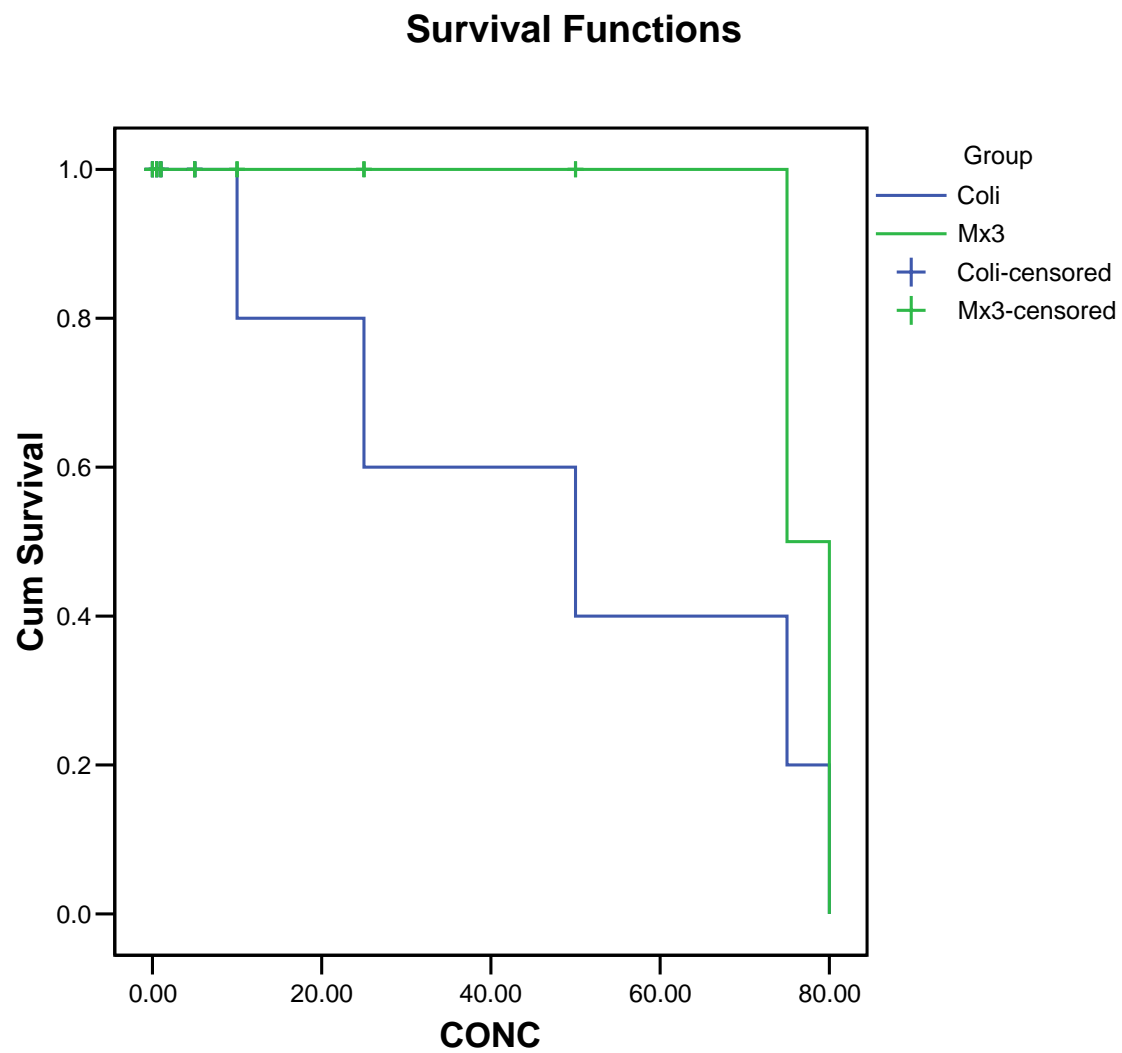


Todos los datos originales de la muestra 3 se encuentran en el Anexo 8.

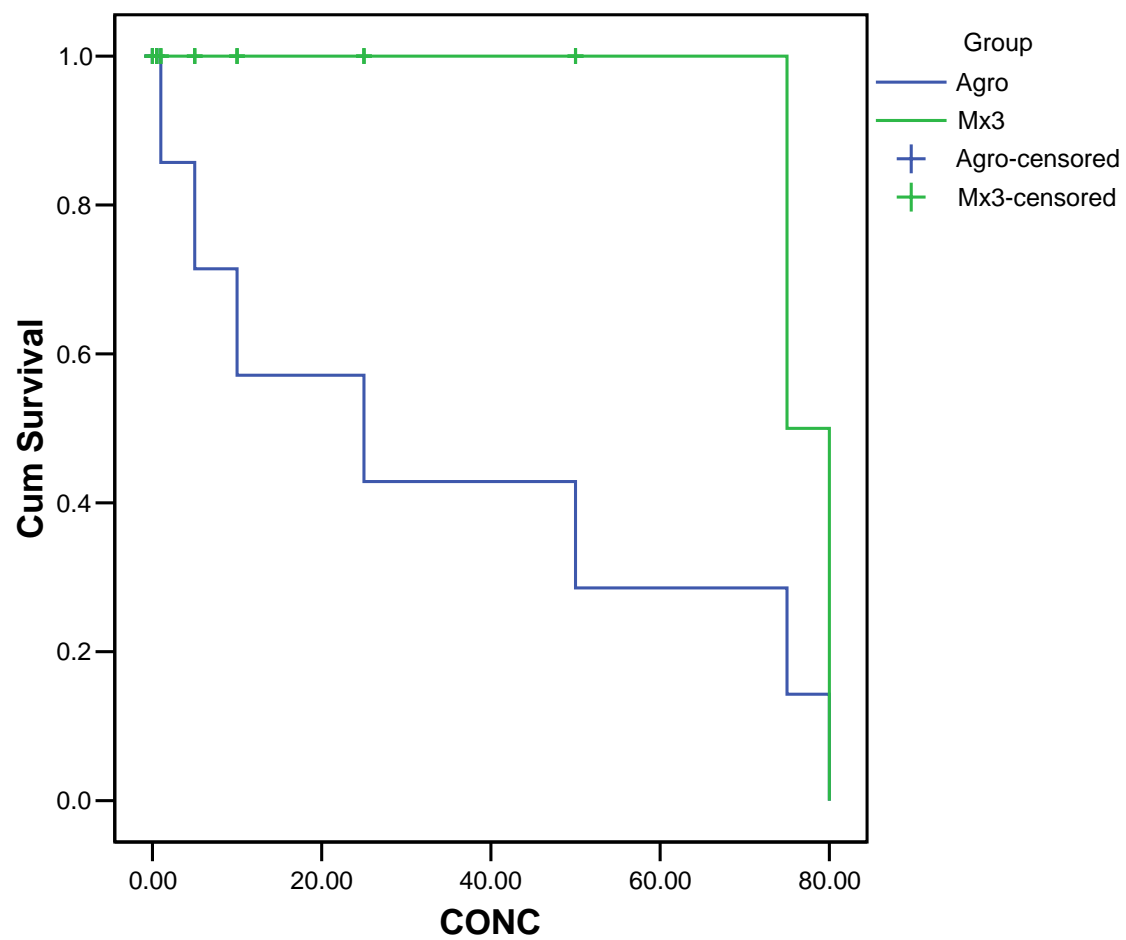
Cuadro 9. Valor P y MIC de la muestra 3 analizado por el método de Kaplan-Meier.

MIC Observado Concentración de Glifosato [mM]	MIC Calculado Concentración de Glifosato [mM]	Valor P comparado con <i>E.coli</i>	Valor P comparado con <i>A. tumefaciens</i>
75	77.50	0.0078	0.0009

Figura 6. Gráficas de la función de sobrevivencia acumulada de la muestra 3 comparada con ambos controles.

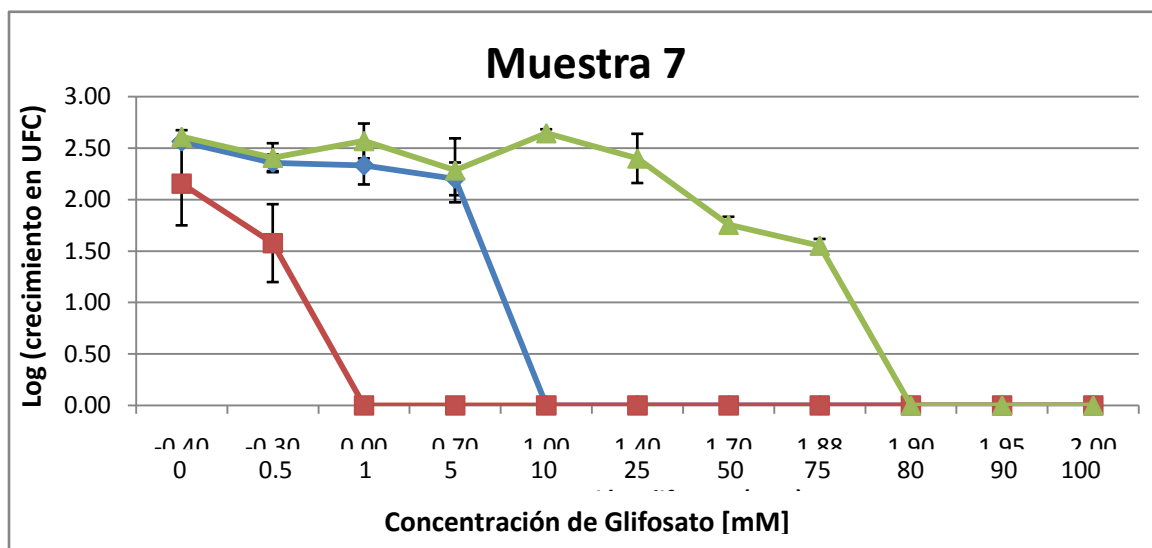


Survival Functions



Muestra 7

Figura 7. Gráfica del promedio de las curvas de crecimiento de la muestra 7 en escala logarítmica comparado con los controles. Control *E.coli* (Azul), control *A.tumefaciens* (rojo), muestra 7 (verde).

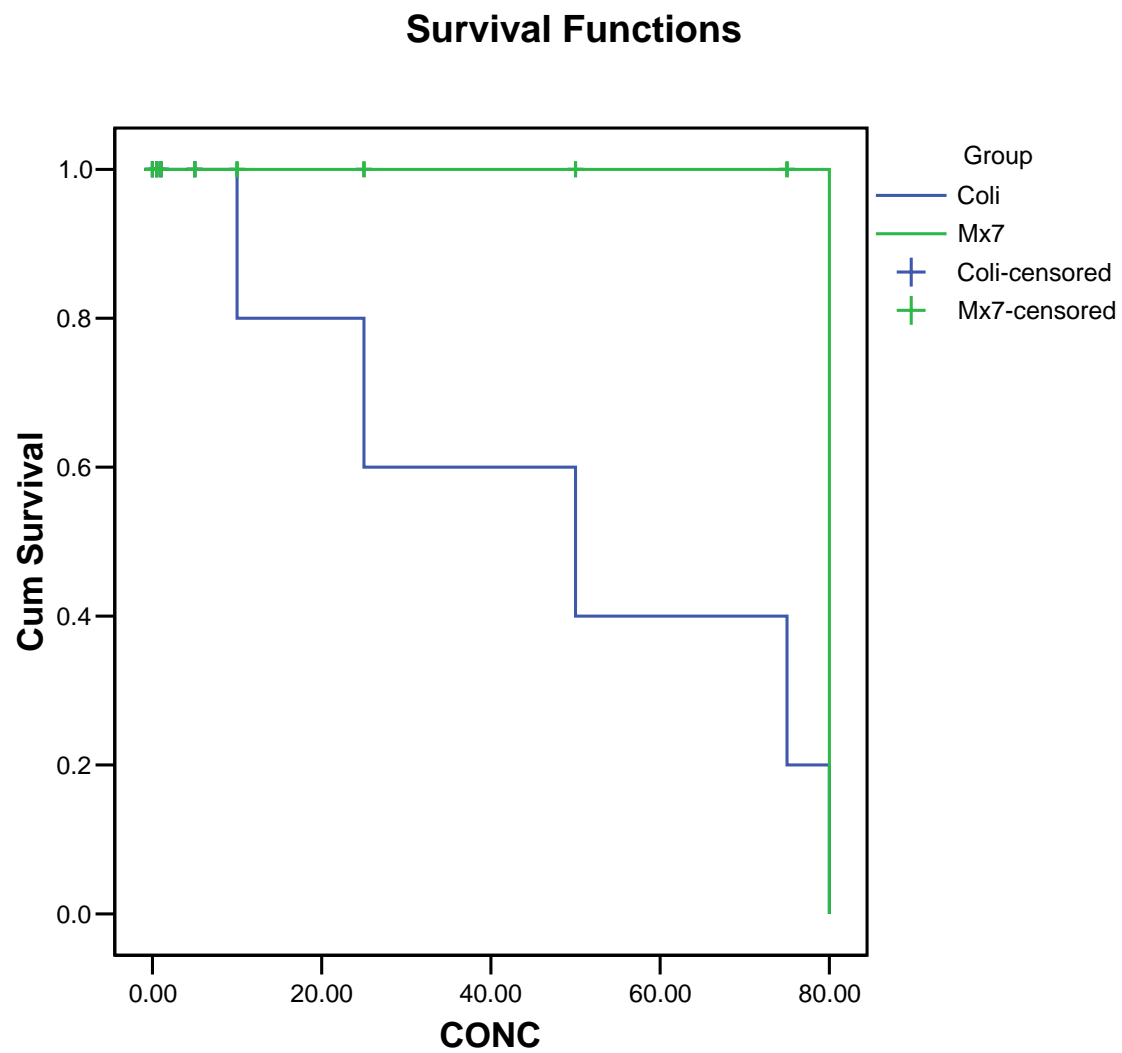


Todos los datos originales de la muestra 7 se encuentran en el Anexo 9.

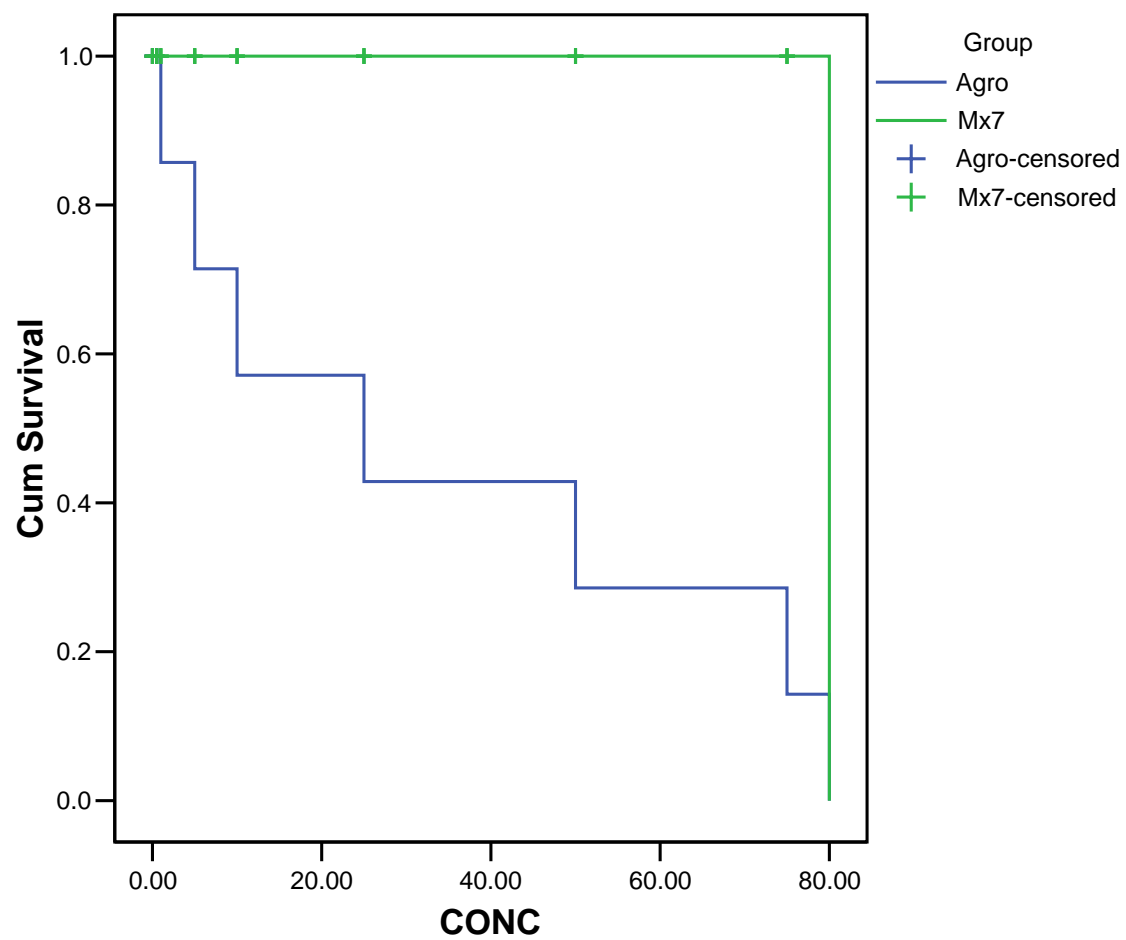
Cuadro 10. Valor P y MIC de la muestra 7 analizado por el método de Kaplan-Meier.

MIC Observado Concentración de Glifosato [mM]	MIC Calculado Concentración de Glifosato [mM]	Valor P comparado con <i>E.coli</i>	Valor P comparado con <i>A. tumefaciens</i>
80	80	0.0002	0.0000

Figura 8. Gráficas de la función de sobrevivencia acumulada acumulada de la muestra 7 comparada con ambos controles.

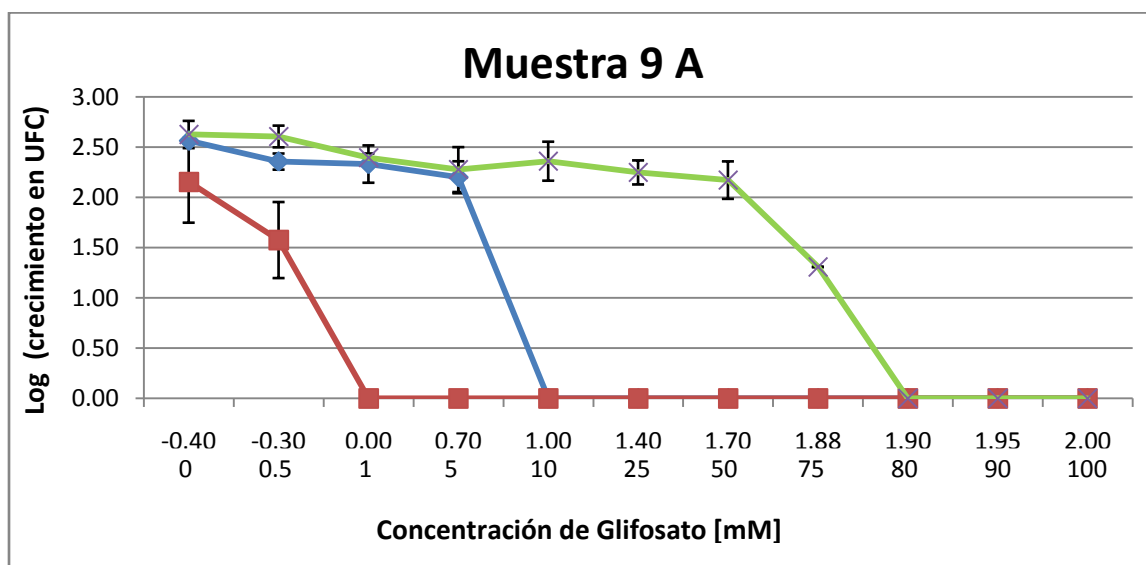


Survival Functions



Muestra 9 A

Figura 9. Gráfica del promedio de las curvas de crecimiento de la muestra 9A en escala logarítmica comparado con los controles. Control *E.coli* (Azul), control *A.tumefaciens* (rojo), muestra 9A (verde).

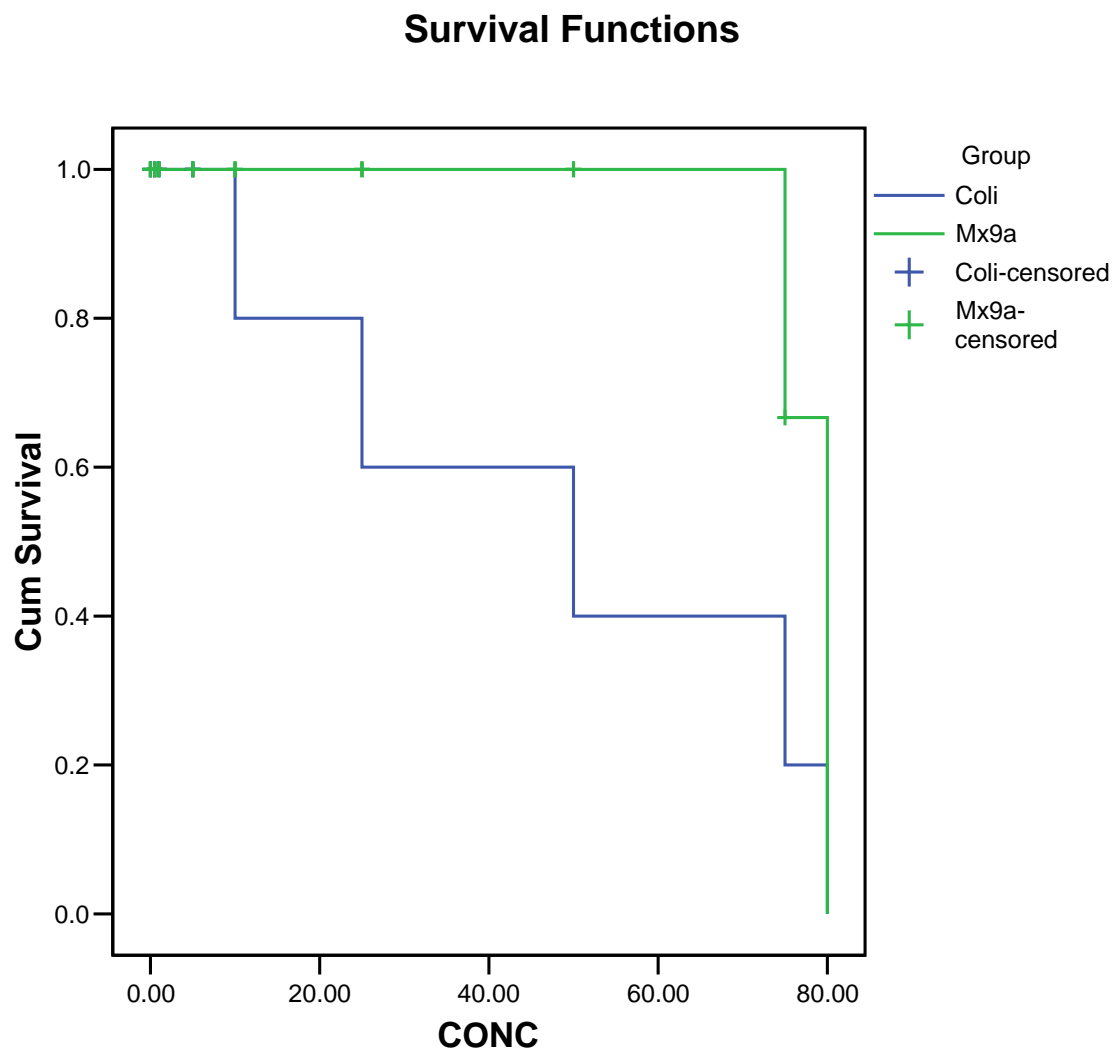


Todos los datos originales de la muestra 9A se encuentra en el Anexo 10.

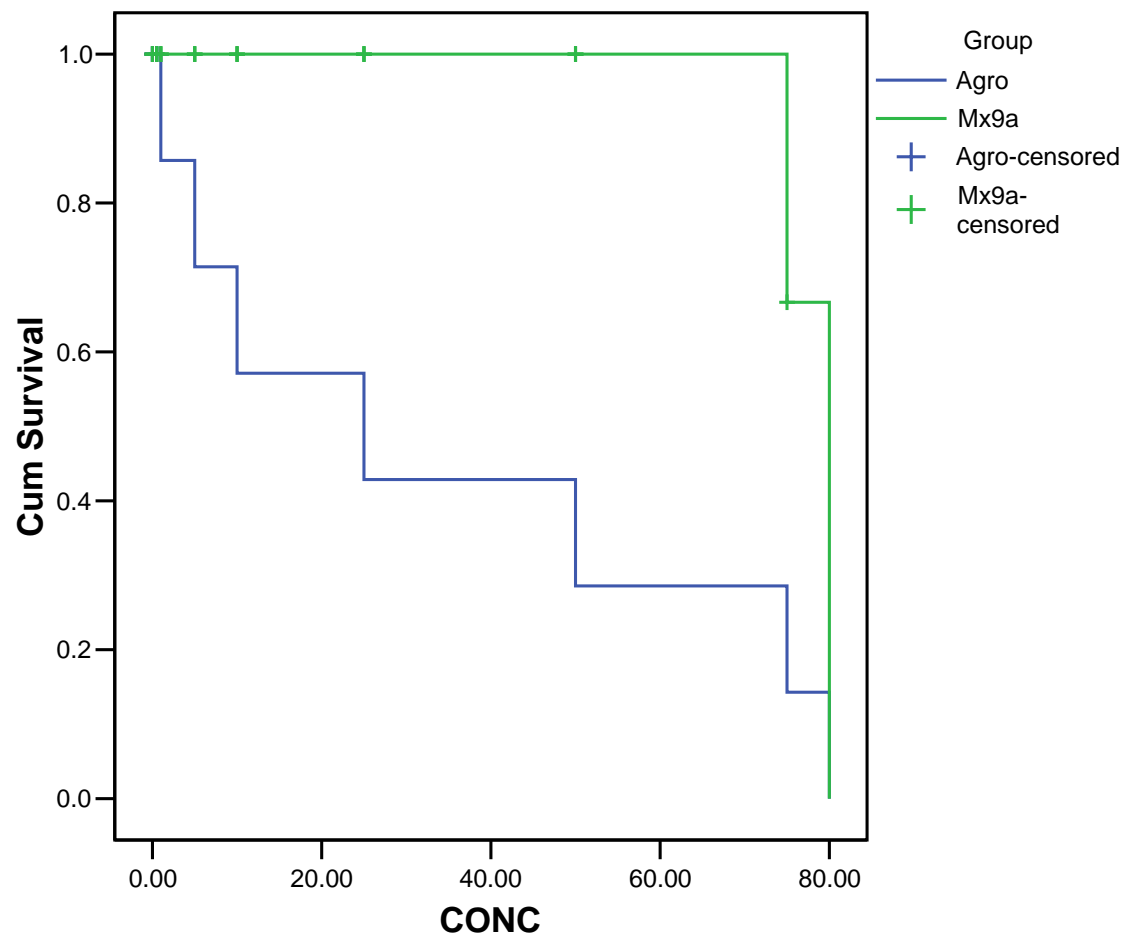
Cuadro 11. Valor P y MIC de la muestra 9A analizado por el método de Kaplan-Meier.

MIC Observado Concentración de Glifosato [mM]	MIC Calculado Concentración de Glifosato [mM]	Valor P comparado con <i>E.coli</i>	Valor P comparado con <i>A. tumefaciens</i>
75-80	78.33	0.003	0.0001

Figura 10. Gráficas de la función de sobrevivencia acumulada de la muestra 9A comparada con ambos controles.

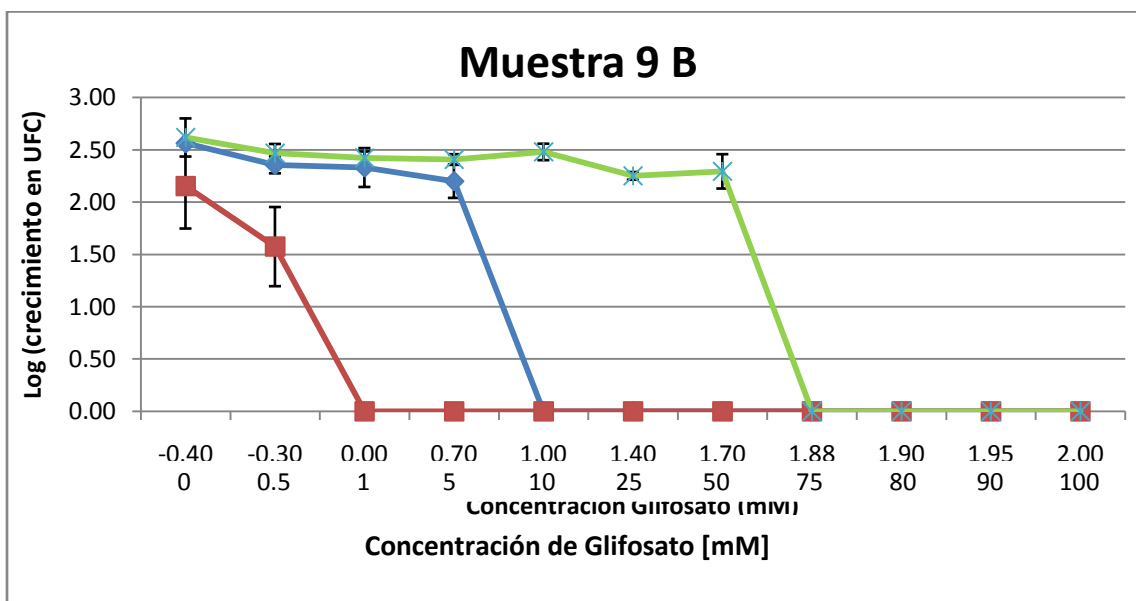


Survival Functions



Muestra 9 B

Figura 11. Gráfica del promedio de las curvas de crecimiento de la muestra 9B en escala logarítmica comparado con los controles. Control *E.coli* (Azul), control *A.tumefaciens* (rojo), muestra 9B (verde).

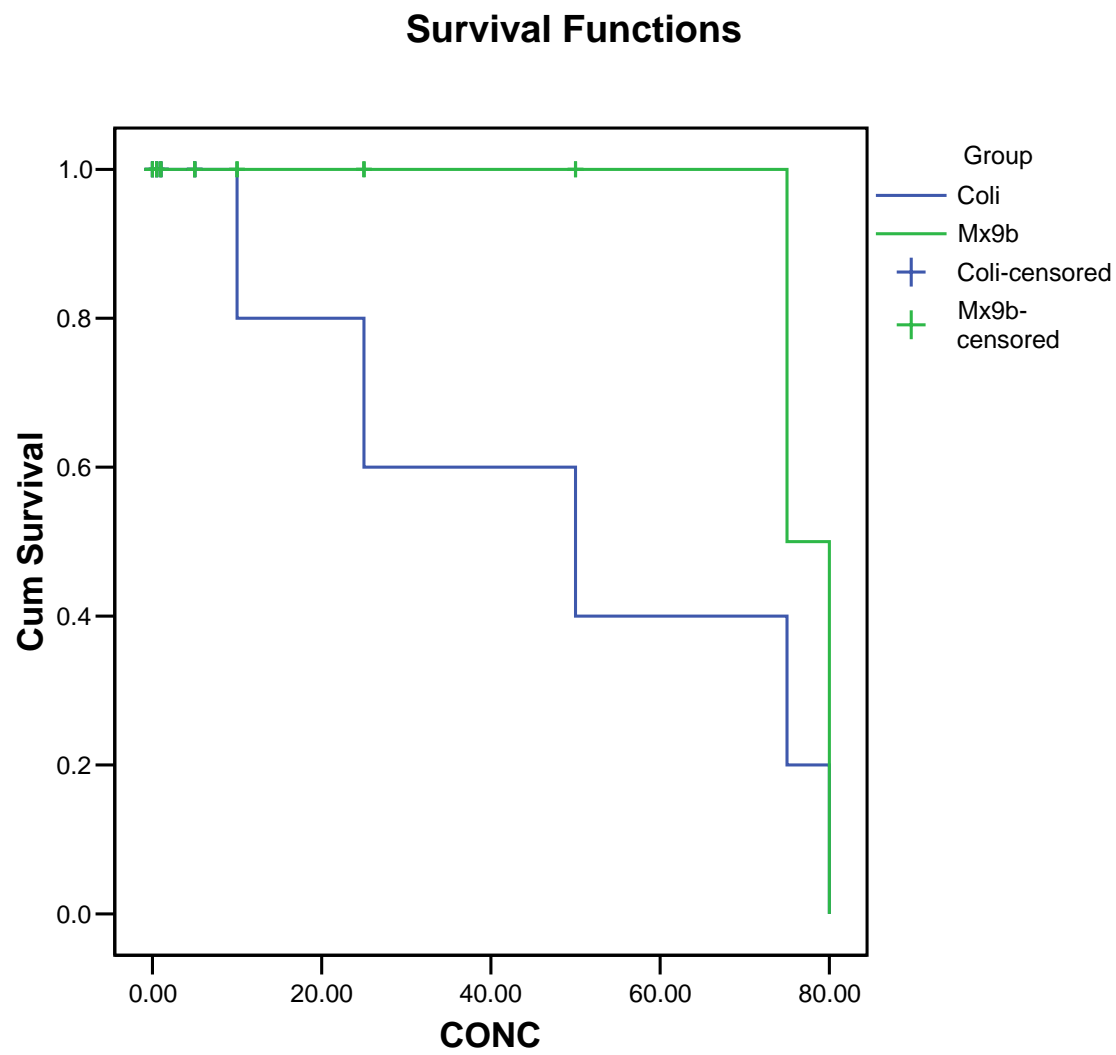


Todos los datos originales de la muestra 9B se encuentra en el Anexo 11.

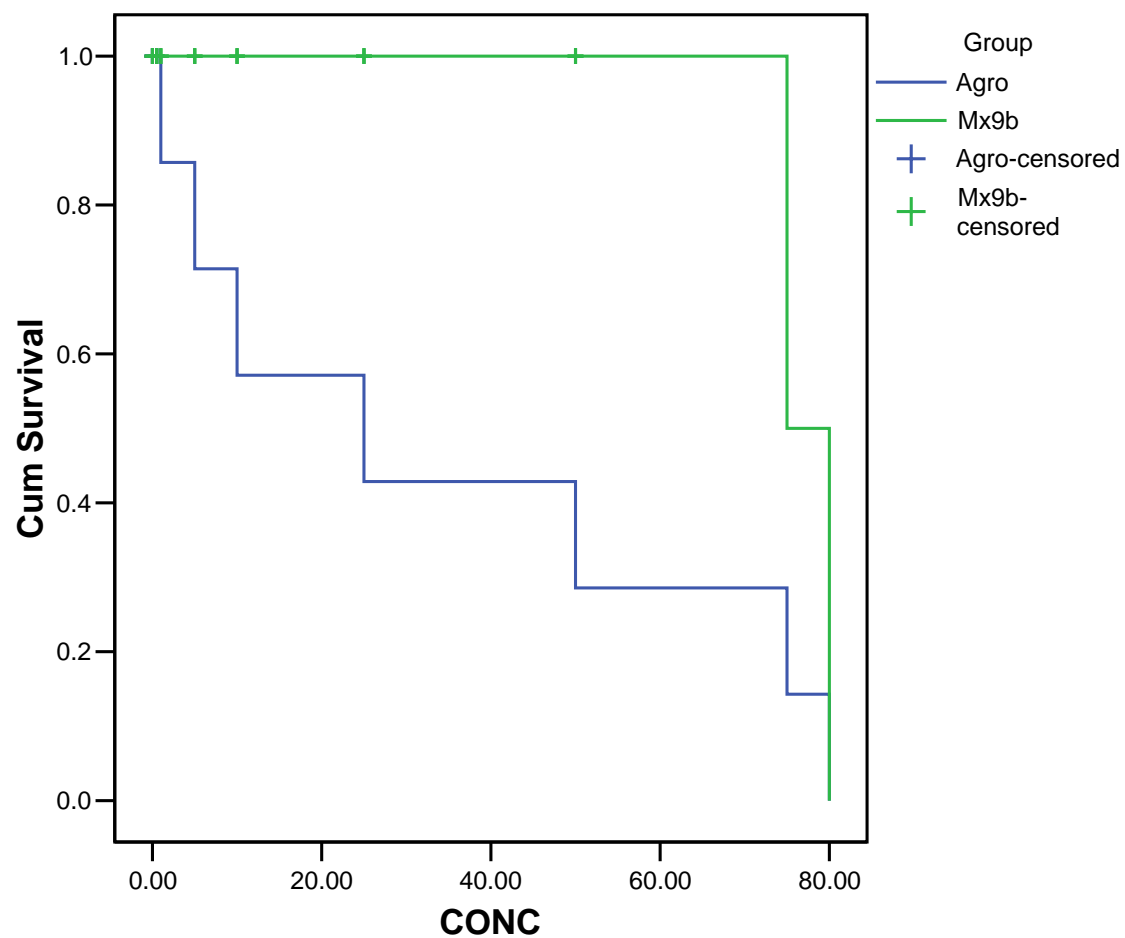
Cuadro 12. Valor P y MIC de la muestra 9B analizado por el método de Kaplan-Meier.

MIC Observado Concentración de Glifosato [mM]	MIC Calculado Concentración de Glifosato [mM]	Valor P comparado con <i>E.coli</i>	Valor P comparado con <i>A. tumefaciens</i>
75	77.50	0.0078	0.0003

Figura 12. Gráficas de la función de sobrevivencia acumulada de la muestra 9B comparada con ambos controles.



Survival Functions



También se obtuvo una gráfica final del análisis de supervivencia de todas las muestras juntas con los controles. Ésta se observa a continuación.

F. Caracterización molecular

Finalmente, se logró definir qué organismo es cada una de las muestras seleccionadas por medio de la secuenciación genética. Los resultados son los siguientes.

Cuadro 13. Organismo identificado para cada muestra de tierra por medio de una secuenciación genética de la región 16S. Este resultado muestra el espécimen más compatible con la muestra según el análisis.

Muestra	Nombre obtenido de la biblioteca genómica	% de pares de bases emparejadas	Total de pares de bases no emparejadas
2	<i>Serratia marcescens</i> (ATCC=13880).	99.35	4
3	<i>Serratia marcescens</i> (ATCC=13880).	99.3	4
7	<i>Enterobacter kobei</i> (CCM=2538)	99.65	4
9 A	<i>Serratia marcescens</i> (ATCC=13880).	99.98	1
9 B	<i>Serratia marcescens</i> (ATCC=13880).	83.36	46

Los resultados originales y la secuenciación de cada muestra están en el Anexo 14.

De cada una de las muestras se obtuvo el árbol filogenético. Los resultados son los siguientes.

Cuadro 14. Árbol filogenético obtenido en la secuenciación genética de cada una de las muestras analizadas.

Muestra 2	<p>Specimen : 2 N.Join: 1.0%</p> <p>Enterobacter kobei (CCM=2538) Leclercia adecarboxylata* (ATCC=23216) Enterobacter nimipressuralis* (ATCC=9912) Enterobacter amnigenus (ATCC=33072) Serratia marcescens marcescens (ATCC=13880)</p>
Muestra 3	<p>Specimen : 3 N.Join: 1.5%</p> <p>Enterobacter amnigenus (ATCC=33072) Raoultella ornithinolytica* (ATCC=31898) Serratia marcescens marcescens (ATCC=13880) Klebsiella pneumoniae rhinoscleromatis* (ATCC=13884) Klebsiella pneumoniae pneumoniae (ATCC=13883)</p>
Muestra 7	<p>Specimen : 7 N.Join: 1.0%</p> <p>Leclercia adecarboxylata* (ATCC=23216) Enterobacter cloacae cloacae (ATCC=13047) Enterobacter cloacae dissolvens* (ATCC=23373) Enterobacter cancerogenus* (ATCC=33241) Enterobacter kobei (CCM=2538)</p>
Muestra 9 A	<p>Specimen : 9A N.Join: 1.0%</p> <p>Raoultella ornithinolytica* (ATCC=31898) Enterobacter amnigenus (ATCC=33072) Enterobacter asburiae (ATCC=35953) Serratia marcescens marcescens (ATCC=13880) Leclercia adecarboxylata* (ATCC=23216)</p>
Muestra 9 B	<p>Specimen : 9B N.Join: 9.0%</p> <p>Enterobacter asburiae (ATCC=35953) Cedecea lapagei (ATCC=33432) Serratia marcescens marcescens (ATCC=13880) Enterobacter nimipressuralis* (ATCC=9912) Enterobacter amnigenus (ATCC=33072)</p>

En Anexo 15 se encuentra el alineamiento de las secuencias obtenidas.

Cuadro 15. Resumen de resultados obtenidos de todas las muestras y controles.

Muestra	MIC Observado Concentración de Glifosato [mM]	MIC Calculado Concentración de Glifosato [mM]	Valor P comparado con <i>E.coli</i>	Valor P comparado con <i>A. tumefaciens</i>	Muestra identificada (% de pares de bases emparejadas)
Control <i>E.coli</i>	10	48	--	--	--
Control <i>A.tumefaciens</i>	1	35	--	--	--
Muestra 2	75	77.50	0.0078	0.0003	<i>Serratia marcescens</i> (99.35%)
Muestra 3	75	77.50	0.0078	0.0009	<i>Serratia marcescens</i> (99.3).
Muestra 7	80	80	0.0002	0.0000	<i>Enterobacter kobei</i> (99.65)
Muestra 9 A	75-80	78.33	0.003	0.0001	<i>Serratia marcescens</i> (99.98).
Muestra 9 B	75	77.50	0.0078	0.0003	<i>Serratia marcescens</i> (83.36).

En el siguiente cuadro se muestra los resultados obtenidos en el análisis en BLAST.

Cuadro 16. Resultados obtenidos en análisis en BLAST

Muestra	ID en secuenciación genética	Número de Accesoión	Primeros tres resultados de BLAST	Valor e
2	Serratia marcescens	GU124498.1	Serratia sp. endosymbiont of Nilaparvata lugens clone M280 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
2	Serratia marcescens	GU124497.1	Serratia sp. endosymbiont of Nilaparvata lugens clone M214 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
2	Serratia marcescens	GQ889261.1	Serratia marcescens strain S20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
3	Serratia marcescens	GU826157.1	Serratia marcescens strain P3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
3	Serratia marcescens	GU124498.1	Serratia sp. endosymbiont of Nilaparvata lugens clone M280 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
3	Serratia marcescens	GU124497.1	Serratia sp. endosymbiont of Nilaparvata lugens clone M214 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
7	Enterobacter kobei	JF346894.1	Enterobacter sp. PYPB03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
7	Enterobacter kobei	HM584796.1	Klebsiella sp. SW81 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0

Continuación Cuadro 16.

Muestra	ID en secuenciación genética	Número de Accesoión	Primeros tres resultados de BLAST	Valor e
7	Enterobacter kobei	GU253335.1	Klebsiella oxytoca strain PYR-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
9 A	Serratia marcescens	FJ897467.1	Serratia sp. NII-44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
9 A	Serratia marcescens	JF429936.1	Serratia marcescens strain 21-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
9 A	Serratia marcescens	JF429935.1	Serratia marcescens strain 21-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0
9 B	Serratia marcescens	JF719838.1	Serratia marcescens strain NS-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3×10^{-170}
9 B	Serratia marcescens	HQ260324.1	Serratia marcescens strain JNB5-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3×10^{-170}
9 B	Serratia marcescens	GU991997.1	Serratia marcescens strain CH1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3×10^{-170}

VI. DISCUSIÓN

A. Controles

Se decidió utilizar *Escherichia coli* XLI-Blue y *Agrobacterium tumefaciens* como controles en este estudio, principalmente porque *E. coli* formaba parte del cepario de laboratorio de microbiología de la UVG. Esta cepa se denomina XL1- Blue, ya que fue una cepa utilizada en el curso de Ingeniería Genética, la cual contiene una secuencia genómica que confiere tolerancia a tetraciclina, lo cual reduce la probabilidad de contaminación en los momentos de realizar inóculos. Lo mismo para *A. Tumefaciens*, tiene una tolerancia a kanamicina y estreptomycin, así disminuyendo la probabilidad de contaminación. En el caso de esta segunda bacteria, no se estaba dentro del cepario del laboratorio, por lo que se pidió una muestra a la Lic. Margarita Palmieri encargada del Laboratorio de Fitopatología de la UVG. Por otro lado, ambas bacterias suelen encontrarse en el suelo lo cual existía una probabilidad de que alguna muestra pudiese ser alguna de esas bacterias.

B. Muestras y curvas de crecimiento

El estudio inició recolectando muestras de distintos puntos de un ingenio donde se siembran cultivos agrícolas a los cuales se les aplica el herbicida glifosato. Como se observa en los resultados, las muestras fueron tomadas de distintos tipos de cultivos y distintos puntos del ingenio. Se seleccionaron al azar cuatro distintos sectores de recolección de muestra. En cada sector se recolectaron muestras en triplicado. Estas muestras en triplicado no se tomaron una al lado de la otra, se recolectaron de puntos separados. Se realizó de esta manera con el fin de tener una mayor probabilidad de adquirir distintos tipos de bacterias y poder obtener resultados distintos. También que la aplicación de glifosato a esos cultivos fue en distintas fechas. Se recolectaron suficientes muestras ya que si algunas no daban los resultados esperados se tenían suficientes muestras más.

Se inició el estudio de investigación con doce muestras de las cuales después se obtuvieron catorce muestras por las características morfológicas de las colonias que se observaban.

A todas estas muestras se les hizo una tinción de Gram con el fin de tener un orientación inicial de con que bacterias se estaba trabajando. Las catorce muestras se sembraron a distintas concentraciones de herbicida y solo seis que crecieron a mayor concentración fueron seleccionadas para seguir en el estudio. Estas seis muestras se volvieron a resembrar de las cuales solo cinco se seleccionaron para continuar en el estudio basado en la capacidad de crecimiento a concentraciones altas de glifosato.

Las curvas de las muestras seleccionadas se realizaron en triplicado con el fin de lograr obtener datos estadísticos y así llegar a una conclusión más certera para saber si se trata de una misma población que los controles o son distintas. Cada curva se realizó en días diferentes, y nunca se llevó a cabo la curva de una misma muestra más de una vez en el mismo día. Se hizo de esta forma porque lo que se quería era medir una reproducibilidad biológica y no de la técnica. Siempre se realizaron curvas de alguna muestra junto a la de algún control con el fin de tener un punto de comparación. La técnica de siembra no se obtuvo de un método ya estandarizado. Para llegar a un método aceptado se hicieron varias pruebas cambiando variables (tiempo, temperatura) hasta que se obtuvieron resultados medibles y reproducibles. Inicialmente se comenzó plaqueando en distintas cantidades, nunca del tubo que se dejaba toda la noche, pero si del segundo. Al mismo tiempo se realizaron pruebas para hacer curvas de crecimiento en tubo (con caldo nutritivo), midiendo el OD600 cada cierto tiempo. Se hicieron varias repeticiones con cada muestra y controles pero los resultados no fueron favorables por lo que se cambiaron los tiempos de medición. Aún así no se obtuvieron buenos resultados por lo que siguió con las curvas en placas con agar nutritivo. Luego en el protocolo utilizando cajas petri, se probó dejar el segundo tubo distintos tiempos en incubación con movimiento continuo pero siempre daban resultados distintos. Con eso se determinó como alternativa la medición de la densidad óptica, como se hacía en el método de tubo el cual no funcionó, y así se observó que cada bacteria tenía un tiempo de crecimiento diferente observando que algunas presentaban sobrecrecimiento cuando otras no siguiendo la misma metodología. Con esto se llegó a la conclusión de plaquear en cierto punto de la curva de crecimiento y se optó por una absorbancia de 0.01 ya que se habían observado con anterioridad resultados aceptables. Junto con esto se cambió la técnica de plaqueo, donde se inició plaqueando con esparcidores de vidrio.

Era un método que daba resultados relativamente buenos pero era demasiado trabajo y demoraba mucho tiempo. Finalmente se probó la técnica de plaqueo con perlas de ebullición la cual si daba los resultados esperados de una forma eficaz y eficiente.

A. Crecimiento en cajas petri

Como se observa al inicio que la muestra número 6 del grupo inicial de la recolección, luego de sembrar las muestras en placas con glifosato [50 mM] ésta ya no creció y se descartó. Pero al mismo tiempo se obtuvieron tres muestras nuevas de las iniciales número 8, 9 y 12, que se dividieron en A y B basándonos en la morfología de las colonias. La mayoría de las colonias presentaban una morfología parecida. Presentaban colonias de tamaño medio, color amarillo claro y algunas beige, brillantes, cóncavas y de borde liso. Pero algunas eran un poco distintas las cuales se dividió la misma muestra en dos. De todas las muestras solo seis de ellas llegaron a crecer a una concentración de [75mM]. De estas se realizó nuevamente una tinción de Gram. Los resultados de la tinción con los que había observado de la morfología de las colonias nos llevó a pensar que definitivamente la muestra 7 era totalmente distinta a las demás, la 1,2,3,9 A y 9 B. En cuanto a las demás se esperaba que fuesen distintas bacterias a pesar de tener características morfológicas similares. Luego éstas se resembraron y solamente cinco lograron crecer a [80mM]. Estas cinco muestras fueron las seleccionadas a continuar en el estudio, Muestra 2, 3, 7, 9 A y 9 B.

Durante el transcurso de selección de las cinco muestras, se realizaban curvas de crecimiento de los controles para optimizar el método. Finalmente se logró a un método adecuado del cual en los resultados se observa que en las curvas de crecimiento de los controles, ambas bacterias tienen un comportamiento distinto en su crecimiento. También al medir el OD₆₀₀ ambas demoraban tiempos muy distintos para llegar a la absorbancia de 0.01. Estas dos cepas fueron el punto de comparación para las cinco muestras seleccionadas. El control *E.coli*, para llegar al OD 0.01 y hacer las curvas de crecimiento, crecía en un promedio de 45 minutos y luego en incubación a 30°C crecía en un promedio de 24 horas para luego poder contar las UFC. Por el contrario *A.tumefaciens*, para llegar al OD 0.01 y hacer las curvas de crecimiento, crecía en un promedio de 80 minutos y luego en incubación a 30°C crecía en un promedio de 48 horas para luego poder contar

las UFC. En cuanto a las muestras, el tiempo requerido para llegar al OD deseado varió entre cada muestra aunque en algunos casos no hubo mayor diferencia.

B. Comparación de ambos controles

Observando las gráficas de crecimiento de los controles, a simple vista se observa la gran diferencia de crecimiento entre ambos. Luego al comparar las de las cinco muestras con ambos controles, se observa que sí existe una diferencia de crecimiento en bacterias sometidas al herbicida glifosato comparado con las que no fueron expuestas a este. La gráfica de los controles decrece de una manera rápida, principalmente *A.tumefaciens*. Contrario a las cinco muestras que decrecen en una concentración de glifosato mucho más elevada llegando a cero. El control *E.coli* en las curvas de crecimiento ya no se observaban colonias en la concentración de [10mM] y en el control *A.tumefaciens* a [1mM]. El MIC de los controles se calculó con el método estadístico de análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Los resultados obtenidos del MIC observado y obtenido son distintos y confusos en el caso de los controles. Para ambos controles, el valor MIC calculado es mayor que el observado lo cual no da un resultado lógico ya que se está observando sobrevivencia a distintas concentraciones de herbicida. La diferencia se debe a que el MIC calculado por medio del método de Kaplan-Meier calcula un análisis de sobrevivencia acumulada. Lo que hace es calcular una regresión lineal de la curva siempre tomando en cuenta todos los valores de concentración de Glifosato utilizados. En este caso no toma en cuenta la concentración [90 y 100mM] ya que ninguna muestra creció a esas concentraciones las eliminamos del análisis estadístico. De estos datos obtiene una regresión lineal con una pendiente negativa, y el punto donde se intercepta la pendiente con el eje x es el valor MIC calculado. Debido a esto el valor MIC calculado de los controles es mucho mayor que el MIC observado. Pero el MIC observado nos da un valor más cercano al valor real, por lo que podemos decir que la concentración mínima inhibitoria de *E.coli* es alrededor de una concentración de glifosato de [10mM], y de *A.tumefaciens* es alrededor de [1mM].

A continuación se muestra un cuadro resumen de los resultados como soporte de la discusión de resultados.

Cuadro 17. Resumen de resultados del estudio.

	MIC Observado [mM]	MIC Calculado [mM]	Valor P comparado con <i>E.coli</i>	Valor P comparado con <i>A.tumefaciens</i>	Muestra identificada (% emparejamiento)	Tinción gram
Control <i>E.coli</i>	10	48	---	---	---	BG(-)
Control <i>A.tumefaciens</i>	1	35	---	---	---	BG(-)
Muestra 2	75	77.5	0.0078	0.0003	Serratia marcescens (99.35%)	BG(-)
Muestra 3	75	77.5	0.0078	0.0009	Serratia marcescens (99.3).	BG(-)
Muestra 7	80	80	0.0002	0.0000	Enterobacter kobei (99.65)	CG(+)
Muestra 9 A	75-80	78.33	0.003	0.0001	Serratia marcescens (99.98).	BG(-)
Muestra 9 B	75	77.5	0.0078	0.0003	Serratia marcescens (83.36).	BG(-)
Sitio de recolección de muestra						
Muestras 2 y 3	Campos aledaños a la siembra de piña donde se aplica glifosato para controlar malezas alrededor de la siembra. Área inclinada y a media sombra. Esta área tuvo aplicación de glifosato el día de la recolección (22 de junio 2010) a las 6 am.					
Muestras 7, 9A y 9B	Área que divide la siembra de aguacate de la siembra de piña. Se aplica glifosato para controlar malezas. Aplicación de glifosato viernes 29 de mayo (aproximadamente 3 semanas).					

*BG(-), CG(+)

C. Cinco muestras seleccionadas

En los resultados obtenidos de la muestra 2, se observa que esta muestra ya no logró crecer a una concentración de glifosato de [75mM]. Este resultado es favorable ya que en cultivos agrícolas en Guatemala aplican glifosato en concentraciones más elevadas cuando se utiliza para eliminar malezas. Las concentraciones van desde [50 – 60mM]. La muestra 2 tiene la tolerancia de crecer a [50mM]. En el análisis estadístico se observa que ambos valores P analizados con los controles son menores a 0.05. Solo al observar las curvas de crecimiento de tolerancia al Glifosato, podíamos decir que si hay diferencia entre los controles y la muestra 2. Con el valor P obtenido, sabemos que estadísticamente si existe una diferencia significativa entre la muestra 2 y ambos controles. El valor MIC observado y calculado varía por 2.5 lo cual indica que la concentración de Glifosato a la que la muestra 2 ya no crece se encuentra alrededor de [75mM]. Finalmente se obtuvo en el resultado de la secuenciación genética que la Muestra 2 es una *Serratia marcescens* con un porcentaje de emparejamiento de 99.35 lo cual es un resultado muy confiable. *Serratia marcescens* es un bacilo gram negativo de la familia Enterobacteriaceae. Es un bacilo motil que puede crecer a una temperatura que oscila entre 5-40 °C, en niveles de pH que varían entre 5 y 9. El ambiente en el cual predomina es en condiciones húmedas. Antiguamente se le denominada *Bacillus prodigiosus*, cuyo hábito natural es el suelo y el agua.

Existe una historia interesante en torno a *S. marcescens* ya que algunas cepas producen prodigiosina, un pigmento rojo (Hume E, *et al.* 2004).

La muestra 3 se comportaba de una forma muy parecida a la muestra 2. Logró crecer a la misma concentración y el tiempo de ambas en llegar a una absorbancia de 0.01 midiendo con un OD 600, en promedio varía solo por cinco minutos. Los resultados de tinción Gram y observación de colonias fueron iguales, bacilos gram negativos. Observando las gráficas de curvas de crecimiento se observa la diferencia de tolerancia comparado con los controles. El MIC observado y calculado varía por 2.5, lo que podemos definir que la muestra 3 alrededor de una concentración de [75mM] ya no crece.

Los valores P obtenidos del análisis estadístico son menores a 0.05 para ambos controles por lo que también podemos decir que estadísticamente la muestra 3 también pertenece a un grupo distinto que los controles. Los resultados de la secuenciación genética muestran que es una muestra bacteriana de *Serratia marcescens* (99.3% emparejamiento), dando un resultado confiable. La gran similitud en el comportamiento entre las muestras 2 y 3 puede deberse a que principalmente son la misma bacteria y ambas muestras se obtuvieron del mismo sector en el campo. Estas muestras fueron recolectadas Campos aledaños a la siembra de piña donde se aplica glifosato para controlar malezas alrededor de la siembra. Estas se recolectaron el mismo día de la aplicación del herbicida y se observa que el MIC de ambas muestras es la concentración mínima que aplican para el control de malezas.

La muestra 7 logró crecer hasta una concentración de [75mM]. Esta concentración es mayor a la cual lograron crecer las muestras 2 y 3. También que la concentración más alta utilizada para el control de malezas. En las gráficas de crecimiento de esta muestra se marca aun más la diferencia entre los controles y la muestra, y se observa que no mostraba un crecimiento tan constante como las otras. Para esta muestra se realizaron más de tres curvas de crecimiento ya que variaban mucho los resultados. La muestra 7 en 5 minutos lograba llegar a una absorbancia de 0.01. La morfología de las colonias era muy parecida a las demás, pero por el contrario la tinción de Gram daba resultados distintos, cocos gram positivos. Estos resultados indican que se trata de una muestra distinta a las muestras 2 y 3, lo cual es de esperarse ya que esta pertenece a un sector de recolección de muestra distinto al anterior. Los valores P obtenidos comparando con ambos controles son menores a 0.05, indicando que estadísticamente pertenece a un grupo distinto a los controles. El valor MIC observado y calculado es el mismo, por lo que la concentración de Glifosato a la que la Muestra 7 ya no crece se encuentra alrededor de [80mM]. La concentración [75mM] a la que logro crecer es más alta que las demás muestras. La muestra 7, al igual que las 9 A y 9B, fue recolectada de área que divide la siembra de aguacate de la siembra de piña donde se aplica glifosato para controlar malezas. Esta bacteria logró crecer a una concentración más elevada a la utilizada para eliminar malezas, [60mM]. El resultado de la secuenciación indica que es una muestra bacteriana *Enterobacter kobei* (99.65% emparejamiento de bases) dando un

resultado confiable. La muestra 7 es una muestra distinta a las muestras 2 y 3 y también crece a una mayor concentración. El sitio donde la muestra 7 se recolectó habían aplicado glifosato tres semanas antes de modo de eliminar malezas. Puede que este sea un factor que influye en la tolerancia y también el que es una bacteria distinta tiene un metabolismo distinto. El resultado de la tinción gram indicaba cocos gram negativos, el cual no concuerda con la secuenciación. La tinción de esta muestra no se realizó correctamente. Pudo haber un error durante el proceso de la tinción, puede que las tinciones no hayan estado en buen estado o alguna falla en el microscopio.

Enterobacter kobei es un bacilo gram negativo de la familia Enterobacteriaceae. Es un bacilo móvil. El nombre kobei viene de un grupo de organismo referidos como NIH grupo 21 del National Institute of Health, Tokyo (Kosako Y, *et al.*, 1996).

La muestra 9A y 9B vienen de la misma muestra inicial. Las colonias a simple vista se observaban distintas, por eso se dividen en A y B, a pesar que el resultado de la tinción Gram es el mismo, bacilos gram negativo. La muestra 9A logró crecer hasta una concentración entre [75 – 80mM]. Se obtuvo este resultado ya que en las curvas de crecimiento en triplicado, en la primera creció hasta concentración [75mM], pero las siguientes dos curvas ya no, solo hasta [50 mM]. La Muestra 9B creció hasta una concentración de [50mM], lo cual es parecido al comportamiento de la 9A. Las curvas de crecimiento de ambas muestras son distintas a los controles. Estadísticamente los valores P obtenidos de las muestras 9 A y 9 B siendo menores a 0.05, nos aseguran que estas muestras pertenecen a grupos distintos que los controles. El tiempo que les demoraba llegar a una absorbancia de 0.01 es muy parecido al de la muestra 7 y distinto al de las primeras dos muestras. Esto resultados indicaban que puede que sean muestras distintas a la 7 y a las 2 y 3. Los valores MIC observados y calculados van en el rango de 75-80 para ambas, por lo que la concentración de Glifosato a la que la muestra 9A y 9B ya no crecen se encuentra alrededor de [80 y 75mM] respectivamente. La secuenciación genética indico que ambas muestras son una misma bacteria, *Serratia marcescens*. La muestra 9 A con un 99.98% de emparejamiento y 9 B 83.36%. Para la 9 A hay un alto grado de confiabilidad en el resultado, contrario a la 9 B. Esto puede deberse a varios factores, pero sabiendo que todas las muestras se procesaron al mismo tiempo y bajo las

mismas condiciones pudo deberse a que el ADN de esta bacteria estuviese degradado. También puede suceder que desde en el inicio de la extracción de ADN, se haya tomado un inóculo muy grande, teniendo así mucha muestra bajando el rendimiento del procedimiento. Las concentraciones a las que lograron crecer es similar a las muestras 2 y 3, solamente la muestra 9 A logró crecer un poco más. Al igual que la muestra 7, éstas se recolectaron del mismo sector donde el glifosato se aplicó tres días antes de la recolección de muestras, esto puede influenciar en la tolerancia al herbicida.

Los resultados de la secuenciación genética nos muestran que todas las muestras son enterobacterias. Este tipo de bacterias es normal encontrar en suelos. Cuatro de cinco muestras pertenecen a la misma bacteria, *Serratia marcescens* (ATCC= 13880). Este es el resultado de las muestras 2, 3 que son recolectadas de un mismo sector y de las muestras 9A y 9B que pertenecen a un sector distinto a las otras. Se obtuvo una bacteria distinta, la muestra 7, *Enterobacter kobei* (CCM=2538). Esta muestra fue recolectada junto con las muestras 9 A y B.

Con los resultados iniciales se había llegado a pensar que de cinco muestras se podría estar trabajando con tres bacterias distintas. Pero con la secuenciación genética, que es un análisis altamente sensible y confiable, mostró que se trabajaba con dos bacterias diferentes. Las muestras 2 y 3 recolectadas del mismo sector y las muestras 9 A y 9 B recolectadas de un sector distinto son *Serratia marcescens*. La muestra 7 que se recolectó del mismo sector que las 9 A y 9 B es una bacteria, *Enterobacter kobei*. Puede que aunque se trate de la misma bacteria *S. marcescens* (muestras 2,3,9A,9B) las muestras 9A y B puede que presenten algún gen que las beneficie a crecer rápidamente bajo las condiciones utilizadas en el estudio en el momento de medir el OD₆₀₀. También que siendo la misma bacteria en el caso de la 9A el MIC es un poco más elevado. Puede que esta bacteria presente un cambio genético que la beneficie a crecer en concentraciones de glifosato más elevadas. A pesar que todas las muestras se sembraron al medir una absorbancia de 0.01, no se tenía una garantía si en el cultivo que se dejó toda la noche en movimiento constante a 36 °C que las bacterias habían llegado o superado la fase estacionaria. Al sembrar una bacteria que ha crecido en un medio líquido a un medio sólido, se recomienda si esto se realiza durante la fase de crecimiento estacionaria. Esto

ya que es cuando las bacterias comienzan a agotar los recursos que están disponibles para ellas.

Esta fase se caracteriza por un valor constante del número de bacterias a medida que se iguala al valor de tasa de muerte. Por el contrario la fase exponencial (o logarítmica) se caracteriza por el período de duplicación celular. Por ello es que a pesar de que todas las muestras y controles se sembraron midiendo una absorbancia 0.01, no se sabía en qué fase de crecimiento bacteriano se encontraba el cultivo inicial. Por lo que en la siembra en agar nutritivo esto puede implicar en variaciones durante el conteo de la cantidad de unidades formadoras de colonias de las muestras.

D. Estadística

Se utilizó estadística de análisis de supervivencia. Esto se basa en estimar el tiempo transcurrido (variable de interés) hasta llegar a un suceso en concreto. La estadística utilizada (Kaplan.Meier) es un método en el que la proporción acumulada que sobrevive se calcula para el tiempo individual de cada sujeto de estudio. Es utilizada en estudios con pequeño número de pacientes. Una mejor alternativa hubiese sido utilizar estadística calculando sobrevivencia no acumulada como la regresión de Cox. La regresión de Cox es una generalización del método de Kaplan.Meier. Ésta consiste en obtener una función lineal de las variables independientes que permite estimar, en función del tiempo, la probabilidad que ocurra el suceso esperado (Carreño, A. 2006). Con ésta se modelan no solo la relación entre la tasa de supervivencia y el tiempo, sino también la relación de diferentes variables para cada sujeto. Por lo que se calcula la tasa de mortalidad como función del tiempo y de variables pronóstico (Molinero, L. 2001). Se utiliza cuando la variable dependiente está relacionada con la supervivencia de los sujetos de estudio y se desea averiguar simultáneamente el efecto independiente de una serie de factores sobre esta supervivencia (Martinez, M. 2006). También puede realizarse un análisis multivariado que se utiliza para determinar contribución de varios factores en un solo resultado. En estudios basados en evidencia resulta útil para explicar un fenómeno considerando variables simultáneas (Martinez, M. 2006).

La determinación del tamaño de muestra es una fase esencial para llevar a cabo una investigación. La estimación del tamaño de muestra, se debe calcular tomando en cuenta un margen de error y un intervalo de confianza. Se determina el nivel de confianza que se desea trabajar (95%), (Rodríguez, S. 2008). Calculando el tamaño de muestra en estudios de supervivencia no acumulada, se estima un riesgo relativo (RR). Esto mide la asociación entre la exposición a un factor y el evento estudiado. Por lo que se necesitan al menos 40 muestras para el estudio. Por lo que se recomienda en estudios similares aumentar el número de muestras (Díaz, P y Fernandez, P. 2002).

Inicialmente se esperaba tener mayor diferencia de bacterias entre las muestras, se obtuvieron dos bacterias diferentes de las cuales ambas lograron crecer a concentraciones iguales o más elevadas utilizadas en aplicaciones de glifosato.

Finalmente, de las cinco muestras estudiadas, basado en los resultados obtenidos, se postulan las muestras 3 y 9A para posteriores estudios de clonación y análisis de un gen responsable que confiere la tolerancia al herbicida Glifosato.

Muestra 3: *Serratia marcescens* con un MIC alrededor de [75mM]

Muestra 9 A: *Serratia marcescens* con un MIC alrededor de [75-80mM]

VII. CONCLUSIONES

1. Se aislaron bacterias de suelo que crecen a una concentración de glifosato más alta que los dos controles.
2. Sí existe diferencia en el crecimiento bacteriano entre bacterias sometidas a una presión ambiental con herbicida glifosato comparadas con bacterias no expuestas a este.
3. Las cinco muestras analizadas pertenecen a un grupo distinto que el control de *Escherichia coli* según el análisis estadístico Kaplan-Meier.
4. Las cinco muestras analizadas pertenecen a un grupo distinto que el control de *Agrobacterium tumefaciens* según el análisis estadístico Kaplan-Meier.
5. El MIC observado y el MIC calculado según el método Kaplan-Meier, son distintos para los controles. El MIC observado es el más acertado a un resultado confiable.
6. El MIC observado y el MIC calculado según el método Kaplan-Meier, son similares para cada muestra. Por lo que ambos MIC se acercan a la realidad.
7. Las muestras 2, 3, 9A y 9B según el análisis genético, son la bacteria *Serratia marcescens* (ATCC=13880).
8. La muestra 7 según el análisis genético, es la bacteria *Enterobacter kobei* (CCM=2538).
9. La secuenciación genética de las cinco muestras fue confirmada con el análisis en BLAST.
10. Todas las muestras son Bacilos Gram negativos, pertenecientes al grupo Enterobacteriaceae.
11. Las muestras 3 y 9A son postuladas para realizar estudios posteriores de clonación del gen que confiere tolerancia a glifosato.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Andrews, Jennifer. 2001. *Determination of minimum inhibitory concentration. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 48, (5-6). Brimingham UK.
2. Almeida de, Marcelo. *Uso de madurantes en Brasil.* 2010. Agencia Paulista de de tecnología y desenvolvimiento de agronegocios. Brasil. Presentación dada por Ing. Gerardo Espinoza, Cengicaña.
3. Arcila Jorge, Villegas Fernando. *Uso de Madurantes.* 1995. Página web CENGICAÑA. Cali, Colombia.
4. Díaz, Pértegas; Fernandez, Pita. 2002. *Cálculo del tamaño muestral para la determinación de factores pronóstico.* Unidad de Epidemiología Clínica. Complejo Universitario Hospitalario, España.
5. Página web de DuPont Agro. 2010. *Herbicidas, Glifosato DuPont.*
6. Boye, *et al.*, 2007. *Identification of bacteria using two degenerate 16s rDNA sequencing primers, laboratory protocol.* Microbiology Laboratory Manual by J. D. Newman, Lycoming and Dr. Dag Harmstad, University of Muenster, Germany.
7. Bozzo, Maria Alexandra, 2010. *Persistencia del glifosato y efecto de sucesivas aplicaciones en el cultivo de soja en agricultura continúa en siembra directa sobre parámetros biológicos del suelo.* Tesis Universidad de Montevideo, Uruguay. 124 pags.
8. Carreño, Agata. 2006. *Análisis de Supervivencia.* Libro de Estadística: Métodos Estadísticos para Enfermería Nefrótica.
9. Nivia, Elsa, *et al.* 2006. *Efectos sobre la salud y el ambiente de herbicidas con glifosato.* Artículo versión electrónica.
10. Gini, Gustavo. Catedrático curso bacteriología. Universidad del Valle de Guatemala 2009.

11. Huanhuan, Wu; Shwars Carl y With Nancy. 2008. *Research Article. The analysis of MIC data for anti-microbial agents from complex experiments*. Canada. Journal of Applied Statistic. 00 (00).
12. Hume, E BH; Willcox, M DP. 2004. *Aparición de Serratia Marcescens como un patógeno de superficie ocular*. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología , 79 (10). Madrid, España.
13. Invest in Guatemala. 2009. Agroindustria.
14. Instituto Valenciano de Microbiología. *Identificación de especies de bacterias por secuenciación de 16S ADN*. 2005. Valencia
15. James, Clive. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010*. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA). USA.
16. Kosako Y. et. al. 1996. *Enterobacter kobei sp. nov., a new species of the family Enterobacteriaceae resembling Enterobacter cloacae*. Japan Collection of Microorganisms, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Wako, Saitama, Japan.
17. Martinez, MA. 2006. *Análisis de Supervivencia y Análisis multivariado*. Manual de Medicina basado en la evidencia. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
18. Ming HE, Yan-Fang NIE and Peilin XU, 2003. *Substitution in Bacterial 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase (EPSPS) Generates Enzymes with Increased Resistance to Glyphosate*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry , Vol. 67, pags. 1405-1409
19. Molinero, Luis. 2001. *Modelos de Regresión de Cox para el tiempo de la supervivencia*. Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión. España.

20. Monsanto Company, 2010. Enlace electrónico.
21. Mutton, Miguel y Mutton, Maria. 2010. *Madurantes*. Profesores del departamento de producción vegetal y tecnología de Universidad Estadual Paulista. Sao Paulo, Brasil. Documento dado por Ing. Gerardo Espinoza, Cengicaña.
22. Nuñez, Osbel. 2010. Catedrático Curso Microbiología Aplicada 1 y 2. Universidad del Valle de Guatemala.
23. Pommerville, Jeffrey. 2007. *Laboratory Fundamentals of Microbiology*. 8. Págs. 896 Alcamo's. Arizona.
24. Rodicio, Maria del Rosatio. y Mendoza, Maria del Carmen. 2004. *Identificación bacteriana mediante secuenciación de ADNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. Universidad de Ovideo, España. Capítulo 11. Departamento de Biología Funcional.
25. Rodriguez, Salvador. 2008. *Como determinar el tamaño de una muestra aplicada a la investigación*. Docente de cómputo de la Escuela Nacional de Biblioteconomía y Archivonomía (ENBA). México, D.F.
26. Satorre, Emilio. 2005. *Cambios tecnológicos en la Agricultura Argentina Actual*. Universidad de Buenos Aires, Investigador independiente CONICET. 15, (87). Argentina.
27. Stalker, David; Hiatt, William y Comai, Luca. 1985. *A single Amino Acid Substitution in the Enzyme 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate Synthase Confers Resistance to the Herbicide Glyphosate*. The Journal of Biological Chemistry. 260,(8). Davis, California.
28. Universidad Nacional del Litoral, Dirección de Asuntos Jurídicos. 2010. *Informe acerca del grado de toxicidad del glifosato*. 542212. Santa Fe, Argentina. Documento dado por Ing. Gerardo Espinoza, Cengicaña.

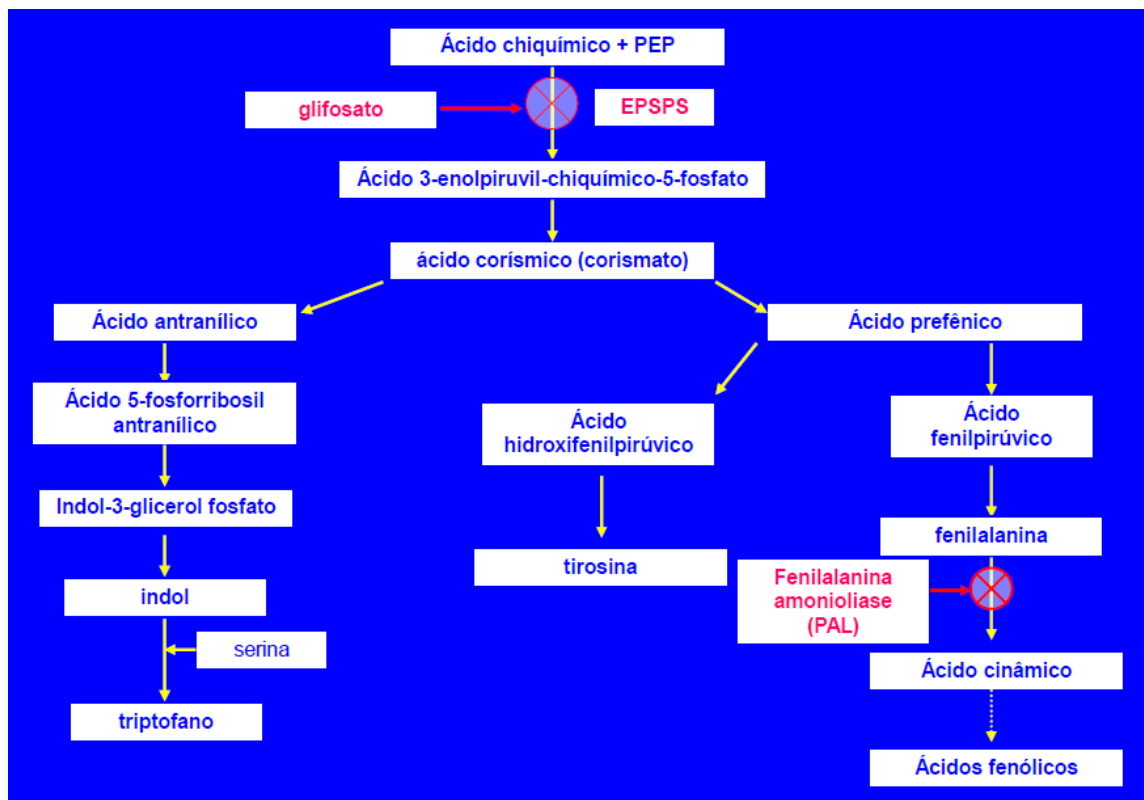
29. Zhou, Min; *et al.* 2006. *Identification of a Glyphosate-Resistant Mutant of Rice 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase Using a Directed Evolution Strategy.* Plant Physiology. 140. (1). Pags. 184-195. American Society of Plant Biologists.

Entrevistas a:

1. Ing. Gerardo Espinoza; 2011. CENGICAÑA. Carretera a Santa Lucia Cotzumalguapa. Escuintla, Km 92.5 Guatemala.
2. Ing. Hugo Recinos; 2011. Ingenio Magdalena. Carretera parcelamiento Los Angeles. Interior finca Bouganvilia. Km. 105. La Democracia, Escuintla. Guatemala.
3. Ing. Mario Melgar; 2011. Ingenio Magdalena. Carretera parcelamiento Los Angeles. Interior finca Bouganvilia. Km. 105. La Democracia, Escuintla. Guatemala.
4. Ing. Sergio Calderón; 2011. Ingenio Magdalena. Carretera parcelamiento Los Angeles. Interior finca Bouganvilia. Km. 105. La Democracia, Escuintla. Guatemala.

IX. ANEXOS

ANEXO 1. DIAGRAMA DE MODO DE ACCION DEL GLIFOSATO



ANEXO 2. PREPARACIÓN MEDIOS DE CULTIVO

A. Agar Nutritivo

1. Pesar la cantidad necesaria siguiendo las instrucciones descritas en el dorso del bote de Agar Nutritivo dependiendo de la cantidad que se necesita preparar.
2. Agregarlo en un Erlenmeyer con la cantidad de agua destilada necesaria y calentar hasta que hierva en un horno con agitación utilizando un magneto.
3. Tapanlo con algodón y gasa, autoclavear durante 30 minutos según lo indique el personal responsable de laboratorio.
4. Dejar enfriar y verter 25 mL de Agar Nutritivo en cajas petri de vidrio previamente esterilizadas. Almacenar en refrigerador a 4° C.

B. Agar Nutritivo con glifosato.

1. Seguir los pasos del 1-3 del preparación de Agar Nutritivo. El glifosato a utilizar está a una concentración inicial de 2.1 M..
2. Partiendo de la concentración, se obtienen las concentraciones deseadas en cada caja petri a utilizar haciendo cálculos matemáticos. Ejemplo.

Para una concentración de 1 mM, con ecuación $C_1V_1=C_2V_2$:

$$\frac{2.1\text{mol}}{L} * X = 1\text{mM} * 25 \text{ mL}$$

$$\frac{2.1\text{mol}}{L} * X = 0.001\text{M} * 0.025\text{L}$$

X= 11.9 µL de glifosato / caja con 25 mL de agar nutritivo.

3. Agregar la cantidad deseada de glifosato a cada caja con 25mL de Agar Nutritivo. Esperar que endurezca y almacenar en refrigerador a 4° C.

C. Caldo Nutritivo

1. Pesar la cantidad necesaria siguiendo las instrucciones descritas en el dorso del bote de Caldo Nutritivo dependiendo de la cantidad que se necesita preparar.

2. Colocar las cantidades deseadas en tubos de vidrio con tapón de rosca no cerrados en su totalidad. En una gradilla autoclavear durante 30 minutos como lo indique la persona responsable del laboratorio.

3. Dejar enfriar y almacenar en refrigerador a 4° C.

-Medio YEP (Yeast Extract Peptone) para crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*.

La receta es para preparar 1000 mL de medio YEP.

1. 10 g de extracto de levadura
2. Peptona a una concentración de [20g/ Litro]
3. Agar-Agar a una concentración de [20g/ Litro]
4. D (+) glucosa a una concentración de [20g/ Litro]
5. Pesar todo según la cantidad de medio que se quiere preparar, agregarlo todo en un erlenmeyer de capacidad adecuada y agregar la cantidad de agua destilada requerida.
6. Calentar hasta que llegue a ebullición con agitación constante con ayuda de un magneto, taparlo con algodón y gasa y autoclavear según las indicaciones del responsable de laboratorio.
7. Luego esperar que llegue a una temperatura alrededor de 40 °C y verter 25 mL por caja petri.

** En este estudio por cada 100 mL de medio preparado se agregaron 100 µL de Streptomina a una concentración de [100 mg/mL] y 50 µL de Kanamicina a una concentración de [100 mg/mL], según lo indicó el departamento que nos brindó la muestra.

ANEXO 3. REALIZACIÓN DE INÓCULOS BACTERIANOS

1. Los inóculos después de obtener colonias asiladas en Agar Nutritivo, utilizando un asa de laboratorio en argolla, flamear en el mechero y esperar 30 segundos cerca de la llama. Recoger una colonia y re-sembrarla en el nuevo medio que se esté utilizando.

Volver a flamear el asa para guardarla.

ANEXO 4. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y DATOS DE CAMPO

1. Las muestras de tierra se recolectan con un recipiente plástico con tapadera de rosca donde este estando limpio, se destapa en el momento de tomar la muestra y utilizando el mismo recipiente tomar una cantidad adecuada de tierra y tapanlo con papel absorbente húmedo luego de la tapadera de rosca no cerrada en su totalidad.

2. Los datos de las muestras son llenados en un machote de esta forma:

Fecha:	Nombre:
Finca:	
Dirección:	
Muestra #:	
Descripción cultivo y ambiente:	
Observaciones:	

ANEXO 5. TINCIÓN GRAM

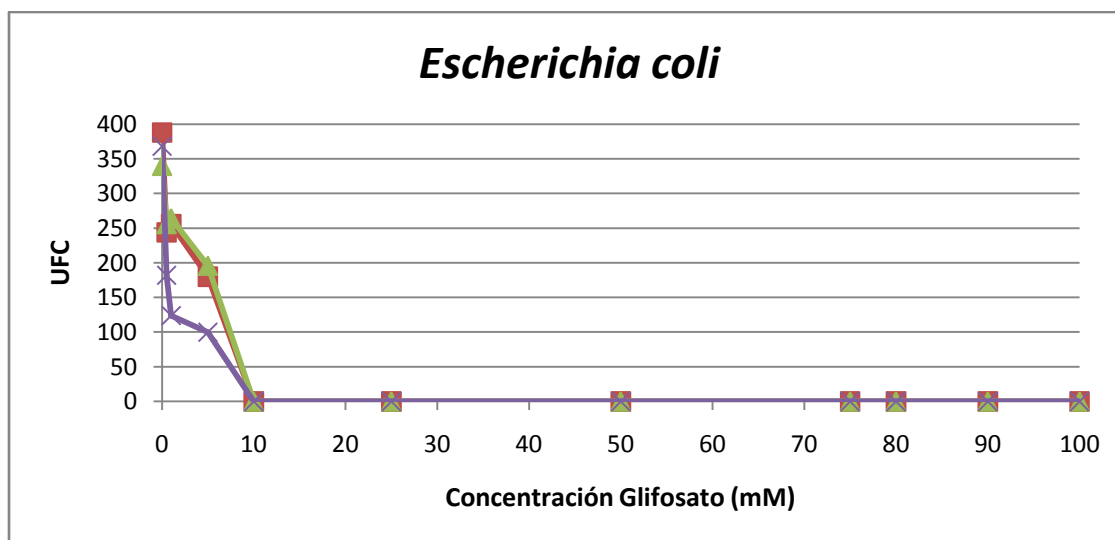
1. Recoger colonia bacteriana con asa en argolla.
2. Hacer un extendido sobre un porta objetos.
3. Dejar secar a temperatura ambiente.
4. Fijar la muestra al calor flameado 3 veces aproximadamente.
5. Agregar cristal violeta y esperar 1 min. Todas las células gram positivas y gram negativas se tiñen de color azul-purpura.
6. Enjuagar con agua.
7. Agregar lugol y esperar 1 minuto.
8. Enjuagar con agua.
9. Agregar alcohol/acetón gota a gota hasta que inicie a correr el color morado.
10. Enjuagar con agua.
11. Tinción con safranina y esperar 1 minuto. Este tinte dejará de color rosado-rojizo las bacterias Gram negativas.
12. Enjuagar con agua.
13. Observar al microscopio óptico a 1000x con aceite de inmersión.

ANEXO 6. DATOS ORIGINALES DE LOS CONTROLES *ESCHERICHIA COLI* Y *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*.

Cuadro 18. Conteo bacteriano control *Escherichia coli* en Unidades Formadoras de Colonia.

Concentración glifosato (mM)	1 UFC	2 UFC	3 UFC	Promedio	Desviación estándar
0	388	340	368	365	24
0.5	244	256	182	227	40
1	256	264	124	215	79
5	180	196	100	159	51
10	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0
75	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0

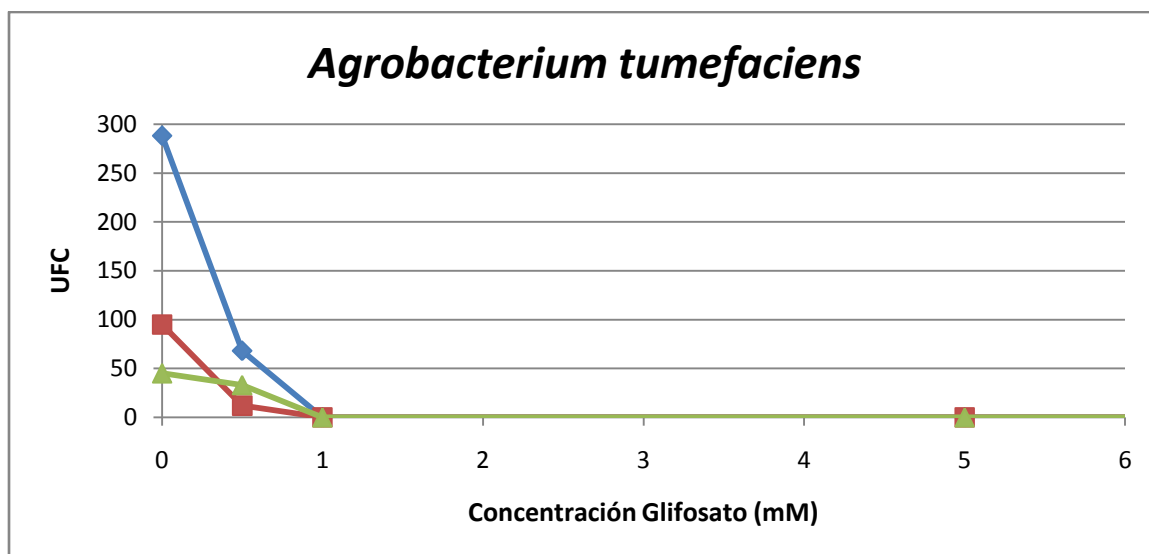
Figura 14. Curvas de crecimiento bacteriano realizadas en triplicado de control *Escherichia coli*.



Cuadro 19. Conteo bacteriano control *Agrobacterium tumefaciens*.

Concentración glifosato (mM)	1 UFC	2 UFC	3 UFC	Promedio	Desviación estándar
0	288	95	45	143	128
0.5	68	12	33	38	28
1	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0
75	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0

Figura 15. Curvas de crecimiento bacteriano realizadas en triplicado de control *Agrobacterium tumefaciens*.



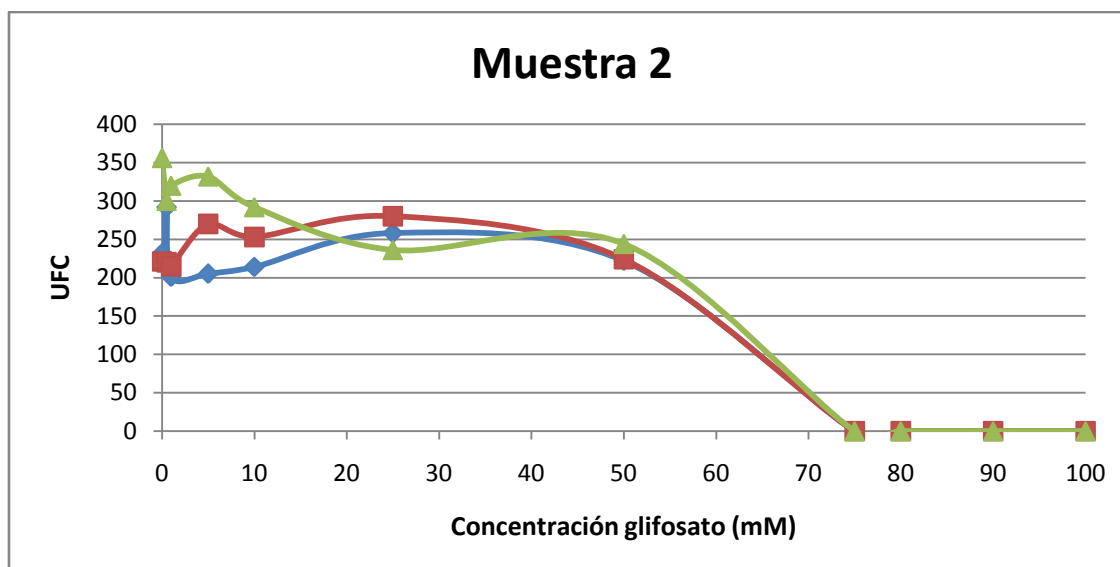
*Los valores de Concentración de glifosato se muestran hasta la concentración de [5mM] con el fin de observar la diferencia al inicio de las curvas, desde [1mM] en adelante las curvas van en crecimiento 0.

ANEXO 7. DATOS ORIGINALES DE LA MUESTRA 2.

Cuadro 20. Conteo bacteriano de muestra 2.

Concentración glifosato (mM)	1 UFC	2 UFC	3 UFC	Promedio	Desviación estándar
0	232	221	356	270	75
0.5	292	220	300	271	44
1	201	215	320	245	65
5	205	270	332	269	64
10	214	253	292	253	39
25	258	280	236	258	22
50	222	224	244	230	12
75	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0

Figura 16. Curvas de crecimiento bacteriano realizadas en triplicado de control de muestra 2.

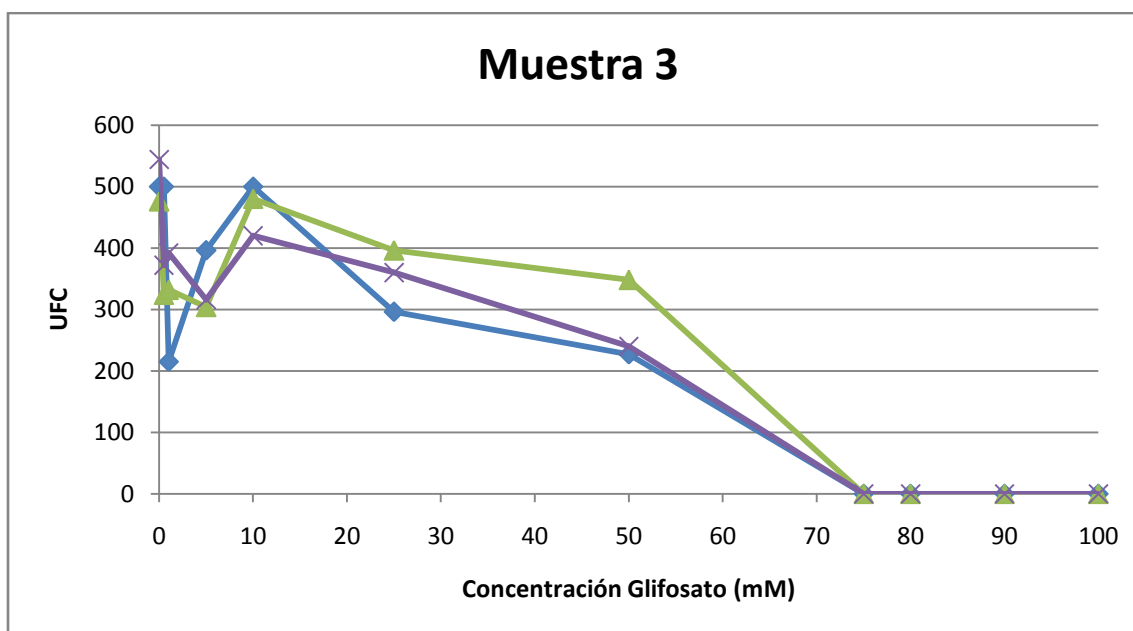


ANEXO 8. DATOS ORIGINALES DE LA MUESTRA 3.

Cuadro 21. Conteo bacteriano muestra 3

Concentración glifosato (mM)	1 UFC	2 UFC	3 UFC	Promedio	Desviación estándar
0	500	476	544	507	34
0.5	500	324	372	399	91
1	215	332	392	313	90
5	396	304	316	339	50
10	500	480	420	467	42
25	296	396	360	351	51
50	227	348	240	272	66
75	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0

Figura 17. Curvas de crecimiento bacteriano realizadas en triplicado de la muestra 3.

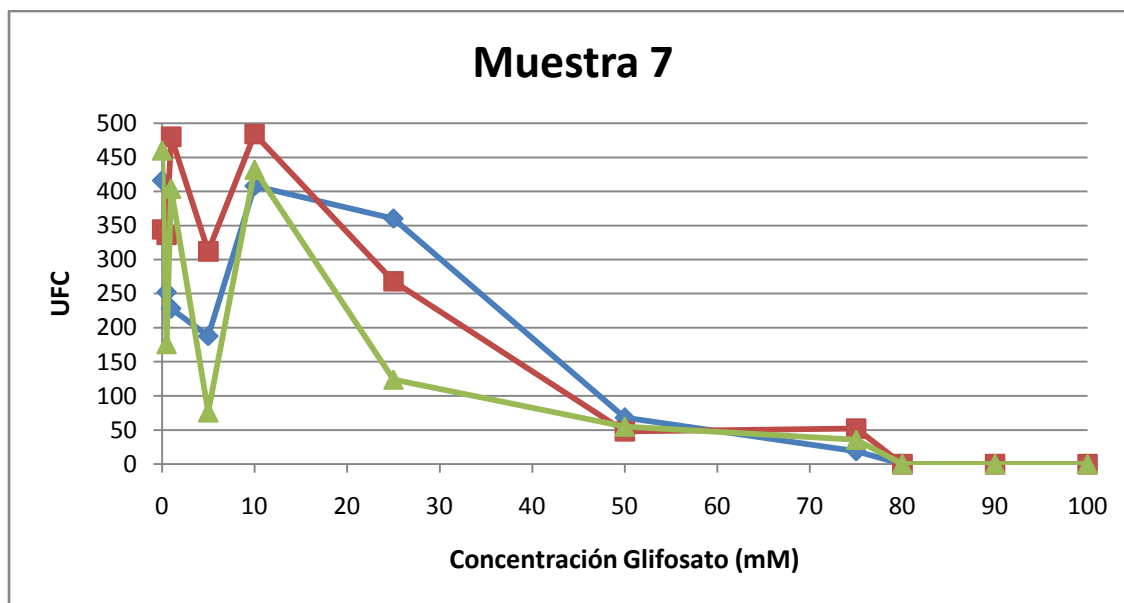


ANEXO 9. DATOS ORIGINALES DE LA MUESTRA 7.

Cuadro 22. Conteo bacteriano de muestra 7.

Concentración glifosato (mM)	1 UFC	2 UFC	3 UFC	Promedio	Desviación estándar
0	416	344	460	407	59
0.5	252	336	176	255	80
1	228	480	404	371	129
5	188	312	76	192	118
10	408	484	432	441	39
25	360	268	124	251	119
50	68	48	55	57	10
75	19	52	36	36	17
80	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0

Figura 18. Curvas de crecimiento bacteriano realizadas en triplicado de muestra 7.

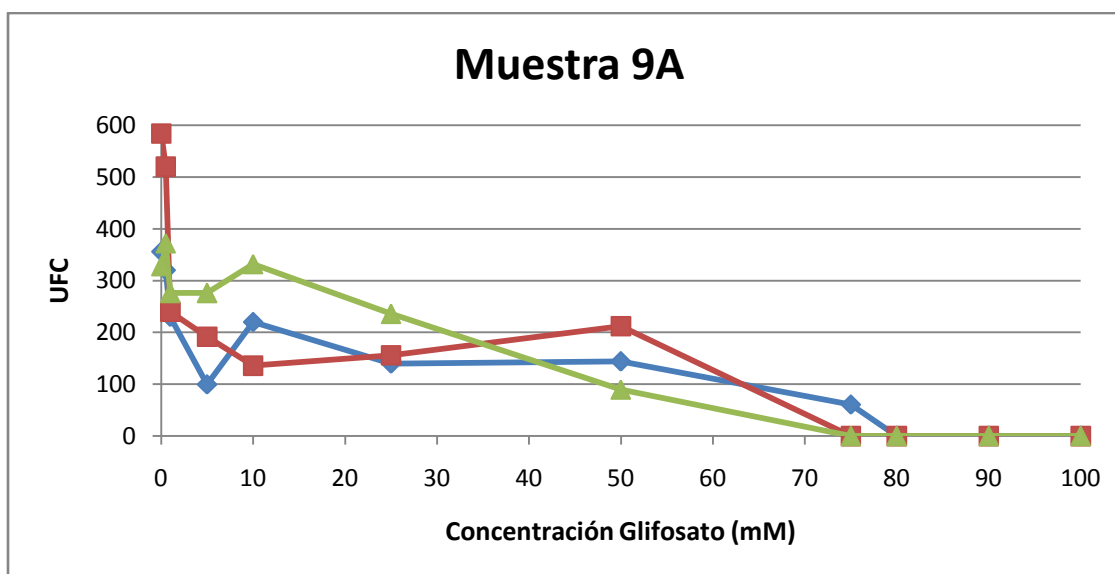


ANEXO 10. DATOS ORIGINALES DE LA MUESTRA 9 A.

Cuadro 23. Conteo bacteriano de muestra 9 A.

Concentración glifosato (mM)	1 UFC	2 UFC	3 UFC	Promedio	Desviación estándar
0	356	584	328	423	140
0.5	320	520	372	404	104
1	230	240	276	249	24
5	100	192	276	189	88
10	220	136	332	229	98
25	140	156	236	177	51
50	144	212	90	149	61
75	61	0	0	20	35
80	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0

Figura 19. Curvas de crecimiento bacteriano realizadas en triplicado de muestra 9 A.

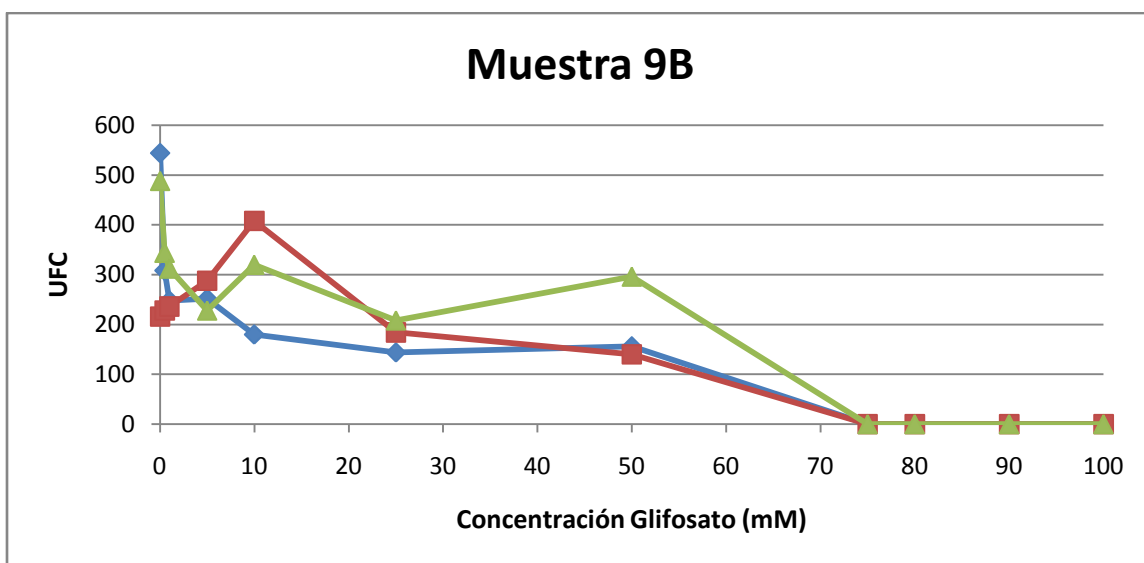


ANEXO 11. DATOS ORIGINALES DE LA MUESTRA 9B.

Cuadro 24. Conteo bacteriano de muestra 9 B.

Concentración glifosato (mM)	1 UFC	2 UFC	3 UFC	Promedio	Desviación estándar
0	544	216	488	416	175
0.5	308	228	344	293	59
1	248	236	312	265	41
5	252	288	228	256	30
10	180	408	320	303	115
25	144	184	208	179	32
50	156	140	296	197	86
75	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0

Figura 20. Curvas de crecimiento bacteriano realizadas en triplicado de muestra 9 B.



ANEXO 12. RESUMEN DE RESULTADO DE LOS PROMEDIOS DE LAS CURVAS EN TRIPLICADO DE LAS MUESTRAS Y LOS CONTROLES.

Cuadro 25. Promedios obtenidos de las curvas de crecimiento realizadas en triplicado de cada muestra y de los controles.

Concentración glifosato (mM)	Control E.coli	Control A.tumefaciens	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 7	Muestra 9 A	Muestra 9 B
0	365	143	270	507	407	423	416
0.5	227	38	271	399	255	404	293
1	215	0	245	313	371	249	265
5	159	0	269	339	192	189	256
10	0	0	253	467	441	229	303
25	0	0	258	351	251	177	179
50	0	0	230	272	57	149	197
75	0	0	0	0	36	20	0
80	0	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0

ANEXO 13. RESUMEN DESVIACIONES ESTÁNDAR OBTENIDAS DE LAS
CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO DE LAS MUESTRAS Y CONTROLES
PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Cuadro 26. Valores de desviación estándar obtenidos de cada muestra y controles.

Concentración glifosato (mM)	Control E.coli	Control A.tumefaciens	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 7	Muestra 9 A	Muestra 9 B
0	24	128	75	34	59	140	175
0.5	40	28	44	91	80	104	59
1	79	0	65	90	129	24	41
5	51	0	64	50	118	88	30
10	0	0	39	42	39	98	115
25	0	0	22	51	119	51	32
50	0	0	12	66	10	61	86
75	0	0	0	0	17	35	0
80	0	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0

ANEXO 14. RESULTADO SECUENCIACIÓN GENÉTICA DE LAS CINCO MUESTRAS SELECCIONADAS.

Muestra 2






Generated at: 05 May 2011 at 15:14:03
GMT-06:00




Project Summary

Project	05052011_KR
Project Creation Date	05 May 2011 at 15:00:24 GMT-06:00
Project Modification Date	05 May 2011 at 15:00:43 GMT-06:00

QC Report Legend

Successful Analysis  Quality Alert  Failed Analysis 

QC Report Results

Specimen	# Samples	Basecalling	Filter	Assembly	Specimen Score	Top Match	% Match	Consensus Length	Library Entry Length	Comments
2	2				30	Serratia marcescens marcescens (ATCC=13880)	99.35	416	489	

Specimen Top 5 Library Match

Specimen	Library	Library Entry Name	% Match	Consensus Length	Library Entry Length	Total Mismatches
2	AB_Bacterial500Lib_2.1	Serratia marcescens marcescens (ATCC=13880)	99.35	416	489	4
2	AB_Bacterial500Lib_2.1	Leclercia adecarboxylata* (ATCC=23216)	97.96	416	487	12
2	AB_Bacterial500Lib_2.1	Enterobacter amnigenus (ATCC=33072)	97.79	416	487	12
2	AB_Bacterial500Lib_2.1	Enterobacter kobei (CCM=2538)	97.77	416	487	13
2	AB_Bacterial500Lib_2.1	Enterobacter nimipressuralis* (ATCC=9912)	97.72	416	487	12

En algunas secuencias de nucleótidos se muestran bases que no son las letras A,T,C,G. Estas son bases donde la secuencia puede variar de forma predecible. **Y**: C+T, **W**: A+T, **S**: G+C, **K**: T+G, **R**: A+G, **M**: A+C.

3' a 5' Cadena Reverse

507	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAAYGCTGGCGGCAGG CTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACA	438
437	AGAGAGCTTG CTCTCTGGGTGACGAGCGGC GGACGGGTGA GTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGG	368
367	GGATAACTAC TGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC GCAAGACCAA AGAGGGGGACCTTCGGGCCT	298
297	CTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGG CTCACCTAGGCGACGATCCC	228
227	TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCC AGACTCCTACGGGAGGCAGCA	158

157	GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCCGT GTGTGAAGAAGGGCYTCGGG	88
87	TTGTAAAGGCACTTTCAGGCGAGGAGGAAGGTGGTGAACCTAATACGYTC AWCAATTGACGTATCGCRGA	18
17	AGAAGGCACGGCWWACG	1

5' a 3' Cadena Forward

1	CGTASAAGYKGCCGYMGGCYTAACAAMTGCAAGTTCGAGCCGGTAGCAC AAAGAGAACTMGCTCTCTGGG	70
71	TTGACGAWGCCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATG GAGGGGGATAACTACTGGAAA	140
141	CGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTTC GGGCCCTCTTTGCCATCAGAY	210
211	GTGCCCAGAYGGGATTTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCG ACGATCCCTAGCTGGTCTGA	280
281	GAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGGACACGGTCCAGACTCCTACGG GAGGCAGCAGTGGGGAATATT	350
351	GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGG CCTTCGGGTTGTAAAGCACTT	420
421	TCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAACCTAATACGTTTCATCAATTGACGTTAC TCGCAGAAGAAGCACCCGRCT	490
491	AACTCCGTGCCAGCAGCCCGTAATA	515

Muestra 3






Generated at: 05 May 2011 at 15:15:18
GMT-06:00




Project Summary

Project	05052011_KR
Project Creation Date	05 May 2011 at 15:00:24 GMT-06:00
Project Modification Date	05 May 2011 at 15:00:43 GMT-06:00

QC Report Legend

Successful Analysis  Quality Alert  Failed Analysis 

QC Report Results

Specimen	# Samples	Basecalling	Filter	Assembly	Specimen Score	Top Match	% Match	Consensus Length	Library Entry Length	Comments
3	2				37	Serratia marcescens marcescens (ATCC=13880)	99.33	478	489	

Specimen Top 5 Library Match

Specimen	Library	Library Entry Name	% Match	Consensus Length	Library Entry Length	Total Mismatches
3	AB_Bacterial500Lib_2.1	Serratia marcescens marcescens (ATCC=13880)	99.33	478	489	4
3	AB_Bacterial500Lib_2.1	Klebsiella pneumoniae pneumoniae (ATCC=13883)	96.83	478	487	17
3	AB_Bacterial500Lib_2.1	Enterobacter amnigenus (ATCC=33072)	96.67	478	487	19
3	AB_Bacterial500Lib_2.1	Klebsiella pneumoniae rhinoscleromatis* (ATCC=13884)	96.66	478	487	19
3	AB_Bacterial500Lib_2.1	Raoultella ornithinolytica* (ATCC=31898)	96.66	478	487	20

3'a 5'

507	TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACAC ATGCAAGTCGAGCGGTAGCA	438
437	CAAGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTC TGGGAAACTGCCTGATGGAG	368
367	GGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGAC CAAAGAGGGGGACCTTCGGGC	298
297	CTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAT GGCTCACCTAGGCGACGATC	228
227	CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTC CAGACTCCTACGGGAGGCAG	158
157	CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGC	88

	GTGTGTGAAGAAGGCCTTCGG	
87	GTTGTAAAGCACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAACCTTAATACGYTCA TCAATKACGTTAYCGCAGAA	18
17	KAAGCACGKGCWGCCGG	1

5'a 3'

1	CCGTWGTMGCWYGGCGGCAGGCTTACACAYTGCAAGTCGAGCCGGTAG CACAAGAGAGCCTTGCTCYCTG	70
71	GGTGACGAAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATG GAGGGGGATAACTACTGGAAA	140
141	CGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCG GGCCTCTTGCCATCAGATGTG	210
211	CCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGA TCCCTAGCTGGTCTGAGAGG	280
281	ATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG CAGCAGTGGGGAATATTGCAC	350
351	AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTC GGGTTGTAAAGCACTTTCAG	420
421	CGAGGAGGAAGGTGGTGAACCTTAATACGTTTCATCAATTGACGTTACTCGC AGAAGAAGCACCGRCTAACT	490
491	CCGTGCCAGCAGCCGCGTTAATAA	514

Muestra 7






Generated at: 05 May 2011 at 15:15:43
GMT-06:00




Project Summary

Project	05052011_KR
Project Creation Date	05 May 2011 at 15:00:24 GMT-06:00
Project Modification Date	05 May 2011 at 15:00:43 GMT-06:00

QC Report Legend

Successful Analysis  Quality Alert  Failed Analysis 

QC Report Results

Specimen	# Samples	Basecalling	Filter	Assembly	Specimen Score	Top Match	% Match	Consensus Length	Library Entry Length	Comments
7	2				35	Enterobacter kobei (CCM=2538)	99.65	477	487	

Specimen Top 5 Library Match

Specimen	Library	Library Entry Name	% Match	Consensus Length	Library Entry Length	Total Mismatches
7	AB_Bacterial500Lib_2.1	Enterobacter kobei (CCM=2538)	99.65	477	487	4
7	AB_Bacterial500Lib_2.1	Enterobacter cloacae cloacae (ATCC=13047)	99.56	477	487	5
7	AB_Bacterial500Lib_2.1	Enterobacter cloacae dissolvens* (ATCC=23373)	99.56	477	487	5
7	AB_Bacterial500Lib_2.1	Leclercia adecarboxylata* (ATCC=23216)	99.35	477	487	5
7	AB_Bacterial500Lib_2.1	Enterobacter cancerogenus* (ATCC=33241)	99.13	477	487	9

3'a 5'

505	TGGAGAGTTTGGATCCTGGCTCAGATTKAACGCTGGCGGCAGGCCTAACAC ATGCAAGTCGAACGGTAGCA	436
435	CAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTG GGAAACTGCCTGATGGAGGG	366
365	GGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCA AAGAGGGGGACCTTCGGGCCT	296
295	CTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGG CTCACCTAGGCGACGATCCC	226
225	TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCC AGACTCCTACGGGAGGCAGCA	156
155	GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTG TATGAAGAAGGCCTTCGGGT	86
85	TGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGYGKTGAGGTTAATAACCTCAK CAATTGACGTTACCCGCRAAG	16
15	AAGCACKACWGCCT	1

5'a 3'

1	ACGTAGCAGWCGGCCGGCGGCTYAAACAYTGCAAGTTCGAMCGGTAGCA CAAGAGAAGCTTTGCTCTCGG	70
71	GTGACGWGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGA GGGGGATAACTACTGGAAACG	140
141	GTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTMCGGG CCTCTYGCCATCAGATGTGCC	210
211	CAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATC CCTAGCTGGTCTGAGAGGAT	280
281	GACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCA GCAGTGGGGAATATTGCACAA	350
351	TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG GTTGTAAAGTACTTTCAGCG	420
421	GGGAGGAAGGYGTTGAGGTTAATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGCA GAAGAAGCACCGGCTAACTCC	490
491	GTGCCAGCAGCCCGTAATA	509

Muestra 9 A






Generated at: 05 May 2011 at 15:16:08
GMT-06:00




Project Summary

Project	05052011_KR
Project Creation Date	05 May 2011 at 15:00:24 GMT-06:00
Project Modification Date	05 May 2011 at 15:00:43 GMT-06:00

QC Report Legend

Successful Analysis  Quality Alert  Failed Analysis 

QC Report Results

Specimen	# Samples	Basecalling	Filter	Assembly	Specimen Score	Top Match	% Match	Consensus Length	Library Entry Length	Comments
9A	2				34	Serratia marcescens marcescens (ATCC=13880)	99.98	419	489	



MicroSeqID v2.1 BIOLAB MICROSEQ

Generated at: 05 May 2011 at 15:16:08
GMT-06:00

Specimen Top 5 Library Match

Specimen	Library	Library Entry Name	% Match	Consensus Length	Library Entry Length	Total Mismatches
9A	AB_Bacterial500Lib_2.1	Serratia marcescens marcescens (ATCC=13880)	99.98	419	489	1
9A	AB_Bacterial500Lib_2.1	Enterobacter asburiae (ATCC=35953)	97.88	419	487	13
9A	AB_Bacterial500Lib_2.1	Enterobacter amnigenus (ATCC=33072)	97.86	419	487	13
9A	AB_Bacterial500Lib_2.1	Raoultella ornithinolytica* (ATCC=31898)	97.76	419	487	14
9A	AB_Bacterial500Lib_2.1	Leclercia adecarboxylata* (ATCC=23216)	97.75	419	487	13

3'a 5'

510	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTKAAMGCTGGCGGCAGGCTTAACACAT GCAAGTCGAGCGGTAGCACA	441
440	GGGGAGCTTGCTCCCYGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCT GGGAAACTGCCTGATGGAGGG	371
370	GGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCA AAGAGGGGGACCTTCGGGCCT	301
300	CTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGG	231

	CTCACCTAGGCGACGATCCC	
230	TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCC AGACTCCTACGGGAGGCAGCA	161
160	GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTG TGTGAAGAAGGCYTCGGGTT	91
90	GTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGARCTTTAATACGGYTCAT CAAATGACGTTACCGCRGA	21
20	RGAAGGCACCGGCTRWACCG	1

5'a 3'

1	CGTAGYGCCTGTCGGCAGGCTTACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACA GGGGAGCCTTGCTCCCYGGGTG	70
71	ACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAG GGGGATAACTACTGGAAACGGTA	140
141	GCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGC CTCTTGCCATCAGATGTGCCAG	210
211	ATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCC CTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC	280
281	CAGCCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG CAGTGGGGAATATTGCACAATGG	350
351	GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGG TTGTAAAGCACTTTCAGCGAGG	420
421	AGGAAGGTGGTGARCTTAATACGTTTCATCAATTGACGTTACTCGCAGA AGAAGCACCGKCTAACTCCGTG	490
491	CCAGCAGCCGCGTAATA	507

Muestra 9B

MicroSeqID v2.1 BIOLAB MICROSEQ






Generated at: 05 May 2011 at 15:16:29
GMT-06:00




Project Summary

Project	05052011_KR
Project Creation Date	05 May 2011 at 15:00:24 GMT-06:00
Project Modification Date	05 May 2011 at 15:00:43 GMT-06:00

QC Report Legend

Successful Analysis  Quality Alert  Failed Analysis 

QC Report Results

Specimen	# Samples	Basecalling	Filter	Assembly	Specimen Score	Top Match	% Match	Consensus Length	Library Entry Length	Comments
9B	2				23	Serratia marcescens marcescens (ATCC=13880)	83.36	237	489	

Specimen Top 5 Library Match

Specimen	Library	Library Entry Name	% Match	Consensus Length	Library Entry Length	Total Mismatches
9B	AB_Bacterial500Lib_2.1	Serratia marcescens marcescens (ATCC=13880)	83.36	237	489	46
9B	AB_Bacterial500Lib_2.1	Cedecea lapagei (ATCC=33432)	81.92	237	488	48
9B	AB_Bacterial500Lib_2.1	Enterobacter asburiae (ATCC=35953)	81.86	237	487	47
9B	AB_Bacterial500Lib_2.1	Enterobacter nimipressuralis* (ATCC=9912)	81.86	237	487	47
9B	AB_Bacterial500Lib_2.1	Enterobacter amnigenus (ATCC=33072)	81.69	237	487	48

3'a 5'

1	CTAGYASYCGGCCGGMGGCYTAACAAMTGCAAGTTCGAGCCGGTAGAA AGGGGAAC TMGCCCTGGGTGAC	70
71	GAGCGCGGAGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGAGGAGGGGGA TAACTACTGGAAACGGTAGCTA	140
141	TACCGCATAACGTCGCAAGACCAAGAGGGGGACCTTTCGGGCCCTCTT TGCCATCAGAYGTGCCCCAG	210
211	AYGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCC TAGCTGGTCTGAGAGGATGAC	280
281	CAGCCACACTGGAGCTGAAGGCCGGTACATGCAAGTCGAGCGGCAGC	350

	AGTGGGGAATATTGCACAATGG	
351	TCACAAGCGGCGGACGGGTGTGTAACGTGTGGGAAACTGCCTGATGGAT TGGGAAGCACTTTGGAAACGG	420
421	TGGCTAATGCCGCACTTCGTCGCAAGACCAAATGACGGGACCCTCGGGC CTAGCACCGGCWAACTCCGTG	490
491	CCAGCAGCCCGTAATA	506

5'a 3'

500	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTKAACGCTGGCTGAAGGCCGGTCACA TGCAAGTCGAGCGGCAGCAGT	431
430	GGGGAATATTGCACAATGGTCACAAGCGGCGGACGGGTGTGTAACGTG TGGGAAACTGCCTGATGGATTG	361
360	GGAAGCACTTTGGAAACGGTGGCTAATGCCGCACTTCGTCGCAAGACCA AATGACGGGACCCTCGGGCCT	291
290	CTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATG GCTCACCTAGGCGACGATCCC	221
220	TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGAACWGAGACACGGTCC AGKCTCCTACGGGAGGCAGCAT	151
150	GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTATGCAGCCATGCCGCGTGTG TGAAGAAGGCCTCGGGTTTAA	81
80	AGCKCTTTCAGCGRGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATACGGCTTCWTCARA WTGACGTACCGCRGARGAGGA	11
10	CCGGCTWGCG	1

ANEXO 15. ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS DE LAS CINCO MUESTRAS Y ARBOL FILOGENETICO ENTRE ELLAS.

```

MUESTRA3      --CCGTWGTMGCWYGCG-----GCAGGCTTACACAY-----TGCAAGTCGAG 41
MUESTRA9A     ---CGTAG-YGCTGTGCG-----GCAGGCTTACACA-----TGCAAGTCGAG 38
MUESTRA7      --ACGTAGCAGWCGGCCG-----GCGG-CTYAAACAY-----TGCAAGTTCGA 40
MUESTRA9B     GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTKAACGCTGGCTGAAGGCCGGTCACATGCAAGTCGAG 60
MUESTRA2      -----GAGATGGA 8
                                           .**: ..

MUESTRA3      CCGGTAGCACAAAGAG-AGCCTTGCTCYCTGGGTGACGAAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG 100
MUESTRA9A     -CGGTAGCACAGGGG-AGCCTTGCTCCCYGGGTGACG-AGCGGCGGACGGGTGAGTAATG 95
MUESTRA7      MCGGTAGCACAAAGAGAAGCTTTGCTCTC-GGGTGACG-WGTGGCGGACGGGTGAGTAATG 98
MUESTRA9B     -CGGCAGCAGTGGGG-AATATTGCACAA-TGGTCACA-AGCGGCGGACGGGTGTGTAACG 116
MUESTRA2      TTGGTG-CCTTCGGG-AACTCTGAGACA--GGTGCTG-CATGGCTGTGCG--TCAG-CTCG 60
      * * . * . : * . * * .   * * . . .   * * * . . .   * * * * : * *   * : * . : *

MUESTRA3      TCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAAATACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAA 160
MUESTRA9A     TCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAAATACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAA 155
MUESTRA7      TCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAAATACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAA 158
MUESTRA9B     TGTGGGAAACTGCCTGATGGATTGGGAAGCACTTTGGAACGGTGGCTAATGCCGCACTT 176
MUESTRA2      TGTTG-----TGAAATGTTGGGTTAAGTCCCG-CAACGAGCGCAACCCTTATCCTT 110
      * * *           * * * : . .   * * * : : . .   * . * * * .   * * * : * .   . . : :

MUESTRA3      CGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGG 220
MUESTRA9A     CGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGG 215
MUESTRA7      CGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTYGCCATCAGATGTGCCAGATGGG 218
MUESTRA9B     CGTCGCAAGACCAAATGACGGGACCCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGG 236
MUESTRA2      TGTGTCCAGCGGTTTCGGCCGGGAACCAAGGAGACTGCCA-----GTGATAAACTGG- 163
      * * * . * * .   : : . .   * * * * . *   . . * . .   * * * *   * * * . * . . * *

```

```

MUESTRA3      ATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGAT-CCCTAGCTGGTCTGAGAG 279
MUESTRA9A     ATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGAT-CCCTAGCTGGTCTGAGAG 274
MUESTRA7      ATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGAT-CCCTAGCTGGTCTGAGAG 277
MUESTRA9B     ATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGAT-CCCTAGCTGGTCTGAGAG 295
MUESTRA2      -----AGGAAGGTGGGG--ATG--ACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGG-GCT 212
               :.:***** * * :*. *:* *.:*.: ****:.* .* . * *.

MUESTRA3      GATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG 339
MUESTRA9A     GATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG 334
MUESTRA7      GATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG 337
MUESTRA9B     GATGACCAGCCACACTG--AACWGAGACACGGTCCAGKTCCTACGGGAGGCAGCA-TGGG 353
MUESTRA2      ACACACGTGCTACAATG--GCATATACAAAGAGAAGCGACCT-CGCGAG--AGCAAGCGG 267
               ..: ** :** **.*. * * * **..: .* :*** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

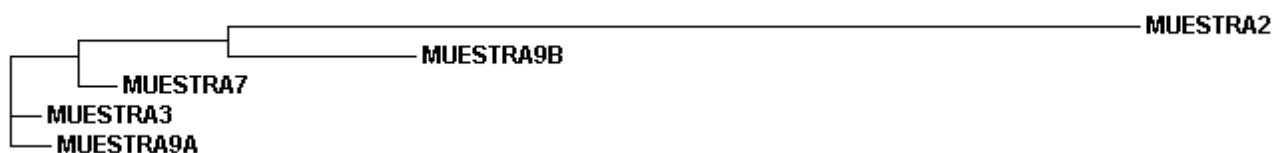
MUESTRA3      GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTT 399
MUESTRA9A     GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTT 394
MUESTRA7      GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTT 397
MUESTRA9B     GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCT-ATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCT- 411
MUESTRA2      ACCTCATAAAGTATG-TCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCG- 325
               ...*.:*..* :*** ** * . ** ** .. .***..* *: * . * .*. * *

MUESTRA3      CGGGTTGTAAAGCACTT-TCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAAGTAAATACG--TTCATCA- 455
MUESTRA9A     CGGGTTGTAAAGCACTT-TCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAAGTAAATACG--TTCATCA- 450
MUESTRA7      CGGGTTGTAAAGTACTT-TCAGCG----- 420
MUESTRA9B     CGGGTT-TAAAGCKCTT-TCAGCGRG-AGGAAGGTGGTGAAGTAAATACGGCTTCWTCAR 468
MUESTRA2      -----GAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACG--TCCCCG- 374
               .** ** :* * **

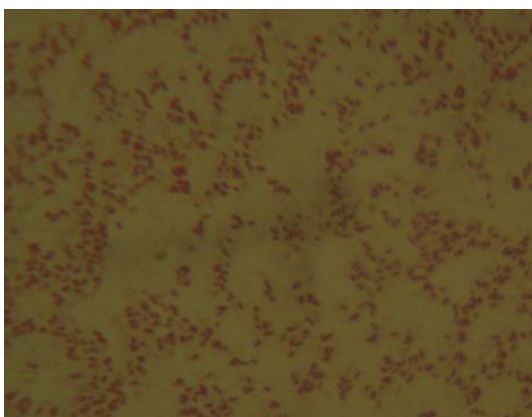
MUESTRA3      ATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGRCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTTAATAA 514
MUESTRA9A     ATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGKCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG-TAATA- 507
MUESTRA7      -----
MUESTRA9B     AWTGACG-TAC-CGCRGARGAGG-ACCGGCTWCG----- 500

```

Árbol filogenético entre las muestras.



ANEXO 16. FOTOGRAFÍAS TOMADAS EN ALGUNOS PASOS DEL ESTUDIO
PARA TENER UN MEJOR CONCEPTO DE LO REALIZADO.



Bacilos Gram Negativos.



Muestra de tierra sembrada en caja con Agar Nutritivo.



Muestra de tierra sembrada en caja con Agar Nutritivo con glifosato a [0.1mM].



Muestra de tierra sembrada en caja con Agar Nutritivo con glifosato a [1mM].



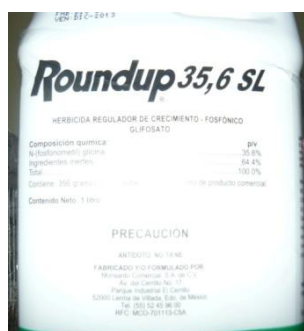
Muestra de tierra sembrada en caja con Agar Nutritivo con glifosato a [10mM].



Incubadora a 37°C con agitación constante. Dentro se observan los tubos con caldo nutritivo inoculados con bacteria que se quedaban toda la noche.



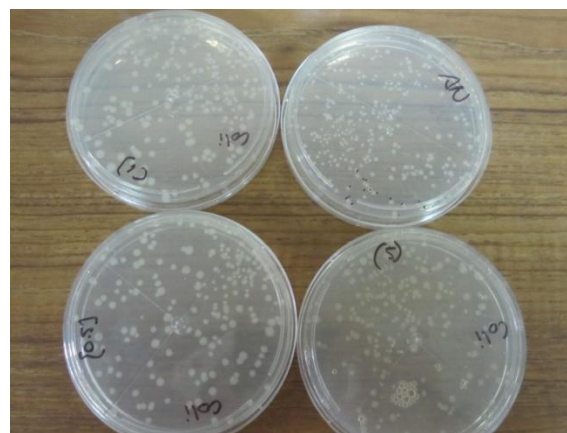
Interior incubadora 30°C con cajas petri en incubación.



Herbicida Glifosato utilizado en el estudio.



Perlas de ebullición y pinzas estériles listas para sembrar.



Cajas petri con crecimiento bacteriano de una de las curvas del control de *E.coli*.



Espectrofotómetro utilizado para la medición de Absorbancia 0.01.



Cultivos de caña, Ingenio Magdalena.
Aplican Glifosato como herbicida y como madurante.