

EVALUACIÓN DEL USO DEL GLIFOSATO SOBRE LA MICROBIOTA DEL SUELO, EN LA ZONA DE AMORTIGUACIÓN DEL PARQUE NACIONAL NATURAL PARAMILLO, EN CÓRDOBA, COLOMBIA.

Presentado por:

Debbye Carolina Castañeda Neuta

Angelica Maria Contreras Garzon

Ingrid Daniela Aguilar Lopez

Asesor interno:

Mg. Ligia Consuelo Sánchez



**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá D.C.**

INTRODUCCIÓN

Glifosato

N-fosfonometil glicina

Componentes

Peso molecular:
169,073 g/mol

Sal isopropilamina de glifosato

Agente tensoactivo

Agua

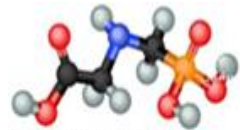


Toxicidad



Toxicidad clase II, toxicidad aguda dérmica y oral relativamente baja.

Mecanismo de acción



Estructura química: $C_3H_7NO_3P$

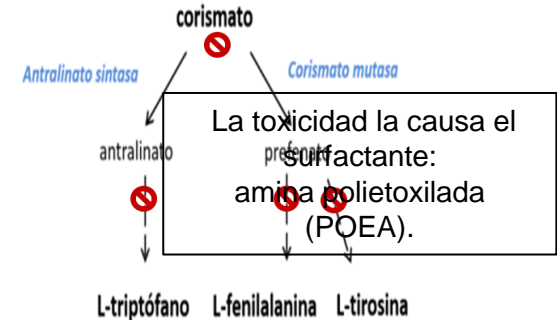
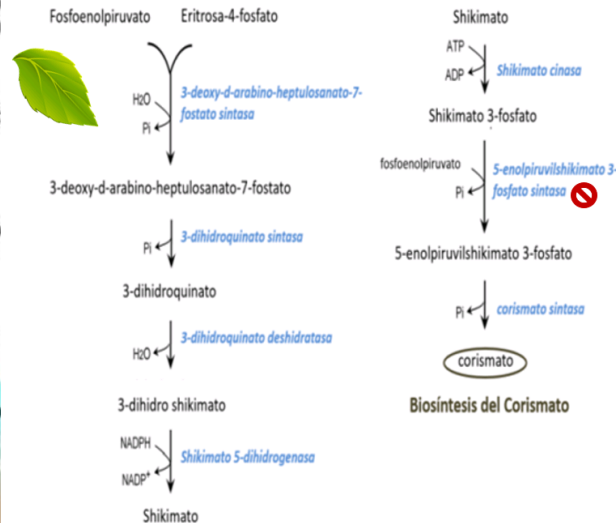
Principio activo del Roundup de Monsanto.

Producido por otras sociedades desde el 2000 (patente pública).



Fuentes: Monsanto, CIBC, USA.

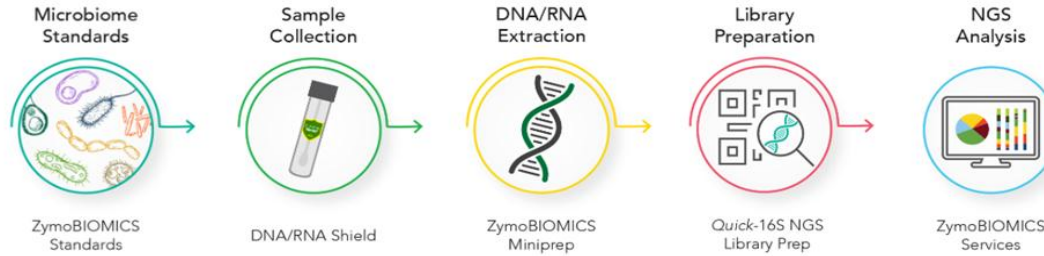
Vía shikimato



L-triptófano L-fenilalanina L-tirosina

Metagenómica

INTRODUCCIÓN



Colombia



Resolución 1065 del 26 de noviembre de 2001 (PECIG).

Resolución 1214 del 30 de septiembre de 2015 (ANLA).

Resolución 708 del 11 de julio de 2016.



12 de enero del año 2013

DNE
Dirección Nacional de Estupefacientes

Áreas de establecimiento de sistemas agroforestales en la finca Tuti Fruti.

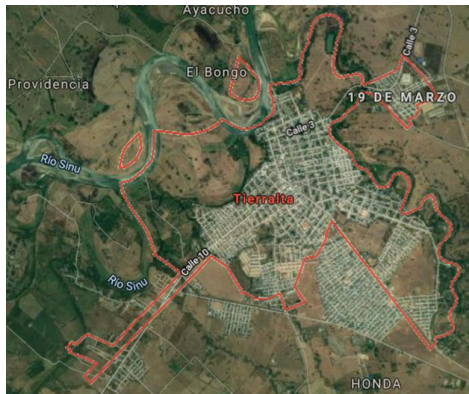
Especies forestales no maderables.

Especies forestales maderables.

Especies forestales frutales

Colombia

Municipio de Tierralta



Presenta una altitud de 51 metros sobre el nivel del mar y una superficie territorial de 5.079 km²



Parque Nacional Natural Paramillo

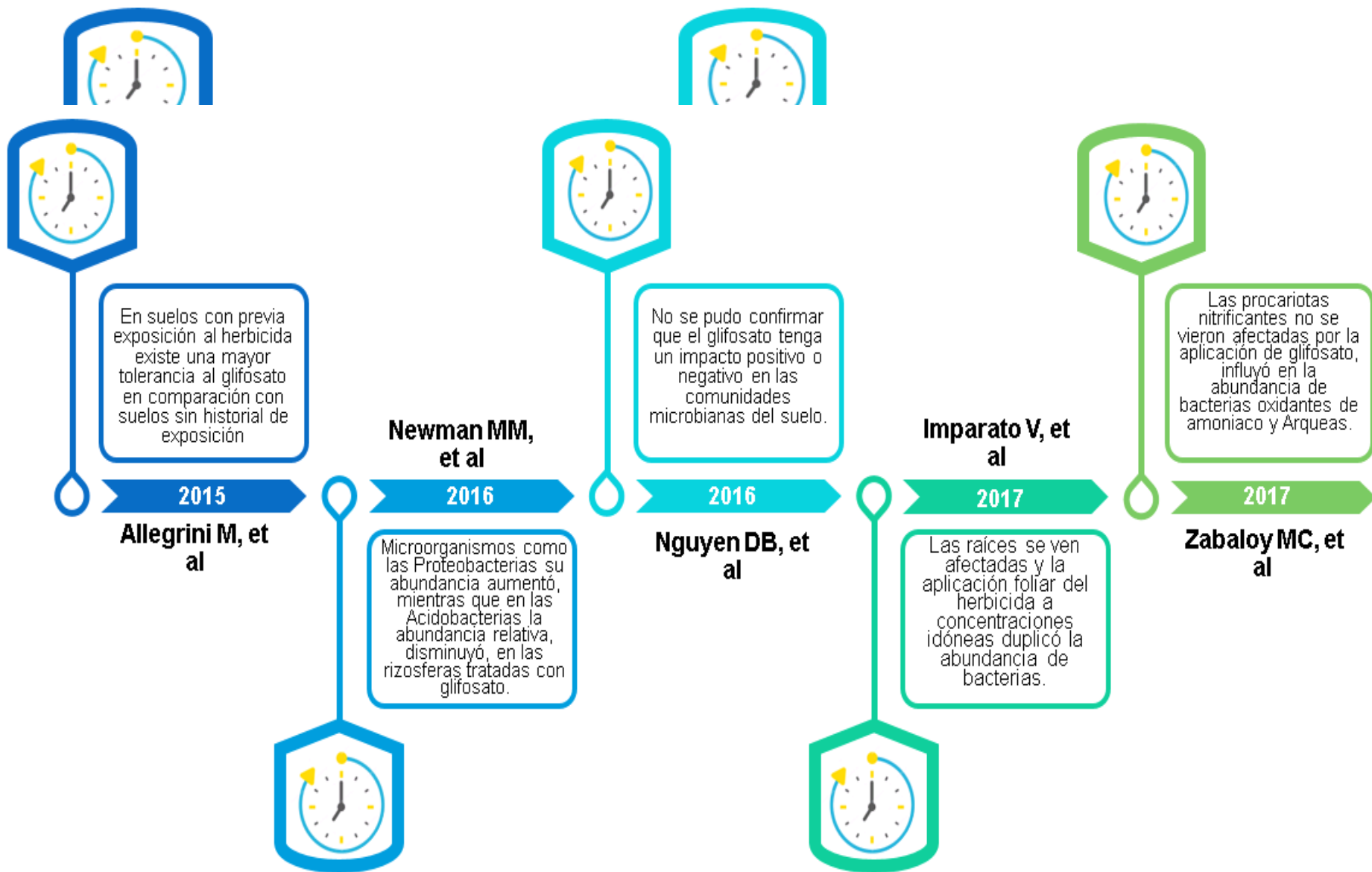


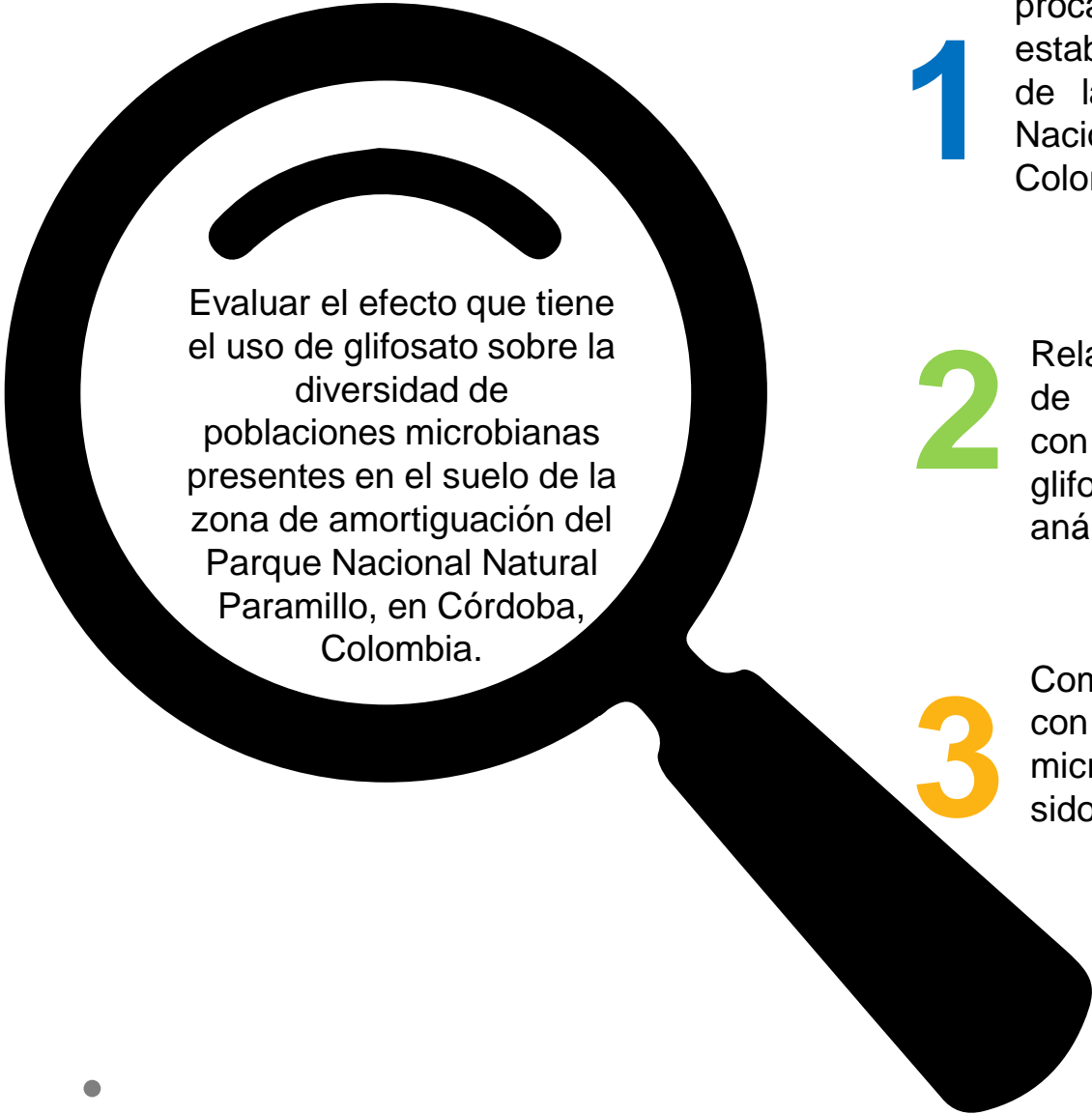
El Parque Nacional Natural Paramillo es una de las 59 áreas protegidas del Sistema de PNN de Colombia, creada en el año 1977, reservándose 460.000 ha.

Vereda Tuis Tuis, Finca Tuti Fruti



Zona amortiguadora del Parque Nacional Natural Paramillo, la cual es considerada una de las reservas forestales turísticas más visitadas de la región.





Evaluar el efecto que tiene el uso de glifosato sobre la diversidad de poblaciones microbianas presentes en el suelo de la zona de amortiguación del Parque Nacional Natural Paramillo, en Córdoba, Colombia.

1

Caracterizar las diferentes comunidades procariotas presentes en el suelo de áreas de establecimiento de sistemas agroforestales, de la zona de amortiguación del Parque Nacional Natural Paramillo, en Córdoba, Colombia por medio de metagenómica.

2

Relacionar las propiedades físico químicas de los diferentes suelos: suelo impactado con glifosato y suelo sin contacto previo con glifosato, con los resultados obtenidos del análisis metagenómico.

3

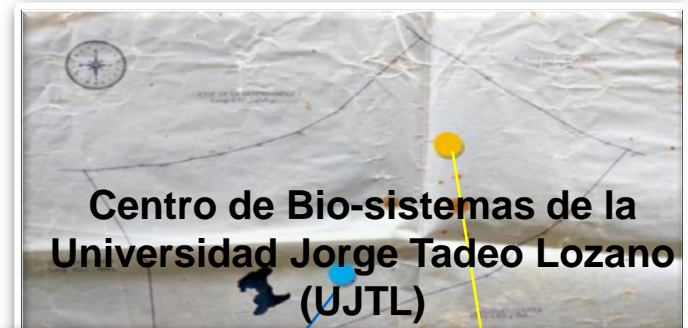
Comparar la microbiota presente en el suelo con previa exposición a glifosato, frente a la microbiota presente en el suelo que no ha sido tratado con dicho herbicida.

Toma de muestra

Suelo de dos zonas diferentes de la finca Tuti Fruti, Vereda Tuis Tuis, Municipio Tierralta, Córdoba, Colombia
Muestreo mes de Julio del año 2018
Conservadas en bolsas plásticas de 1.0Kg, Temperatura entre 4-6 °C

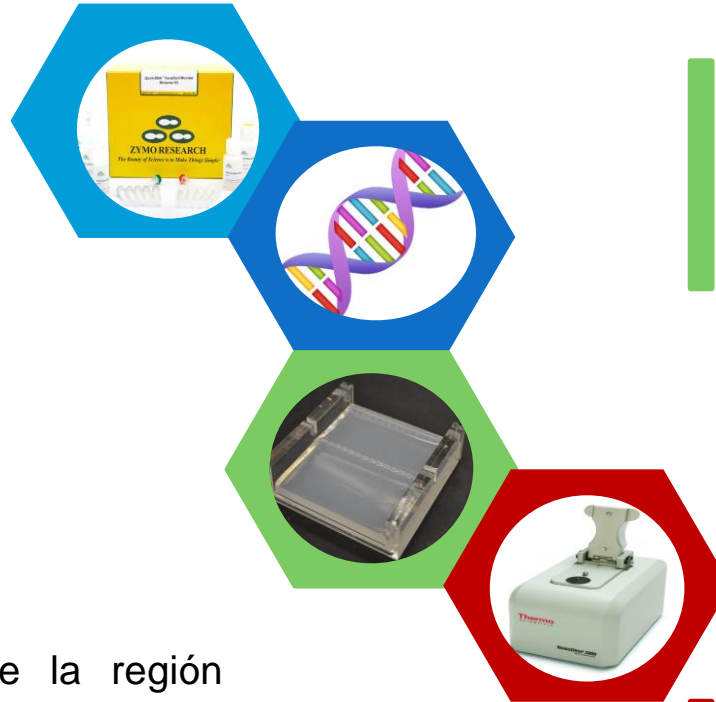
Se tomaron 10 submuestras de suelo, a una p entre 0-2 Finalmente de recolectó 1.0 k

Análisis Físico Químico



Extracción ADN

Se utilizó el Kit ZR Soil Microbe DNA MiniPrep™ (Zymoresearch, CA, USA).



PCR

Primers universales de la región 16S del ADNr (16S-8F 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3' y 16S-1492R 5' - CGGTTACCTTGTTACGACTT - 3').

Electroforesis

Electroforesis en gel de agarosa al 0.5%, teñido con GelGreen® Nucleic Acid Gel Stain y corrido en buffer TBE 0.5X.

Cuantificación

Enviado a la Universidad Nacional de Colombia, donde se empleó el equipo Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) para su cuantificación.

La muestra fue enviada al servicio de secuenciación dirigida ZymoBIOMICS® para análisis de microbiomas (Zymo Research, Irvine, CA)

Preparación de la biblioteca 16S
Análisis bioinformático



Kit Quick -16S
™ Program Dada2
v3-Qiime
Rese IRIS
Irvine,
CA).

PCR en
tiempo real

Cuantificación
con lecturas
de fluorescencia

Fase 1: Parámetros Físico químicos del suelo

PARÁMETRO ANALIZADO	SUELO CON GLIFOSATO	SUELO SIN GLIFOSATO
pH	5.2	4.6
Nitrógeno	38,4 mg*Kg	41,0 mg*Kg
Calcio	1269 mg*Kg	574 mg*Kg
Fósforo	3 mg*Kg	2 mg*Kg
Aluminio (Acidez intercambiable)	1,16 cmol+*Kg	4,21 cmol+*Kg
Ca/Mg	1,60	1,56
Ca/K	27,32	8,26
Mg/K	17,03	5,30
(Ca+Mg)/K	44,35	13,56
Materia Orgánica	1,43%	1,93%



Rampelotto PH et al. (2013)

Concluyen que el pH del suelo regula la abundancia de filos como Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacterias, Firmicutes y Gemmatimonadetes.

Francis CA et al y Daims et al (2007) (2015)

En el suelo se encuentran diferentes microorganismos que son fijadores del nitrógeno.

Khalajabadi SS. (2012)

En suelos con pH ácido la disponibilidad es limitada, resultados que se ven reflejados en el valor deficiente de los suelos.

Khalajabadi SS. (2016)

Cuando el suelo presenta un pH ácido se produce mayor concentración de aluminio intercambiable, que puede resultar tóxico. Afecta de igual manera la disponibilidad del fósforo al formar compuestos insolubles con el aluminio.

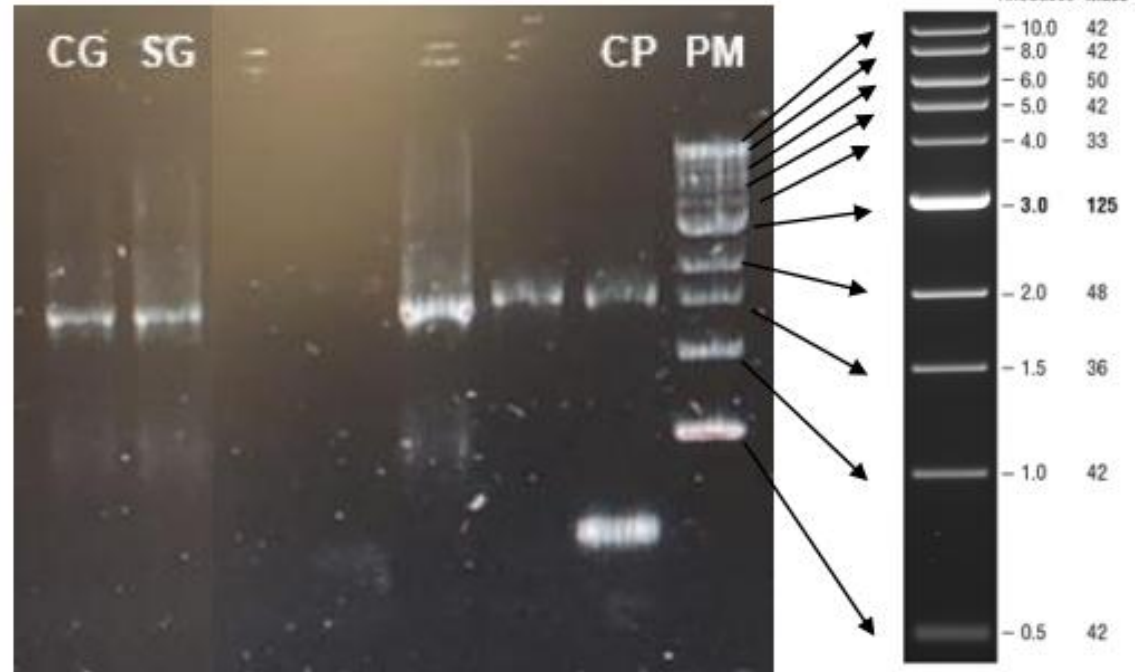
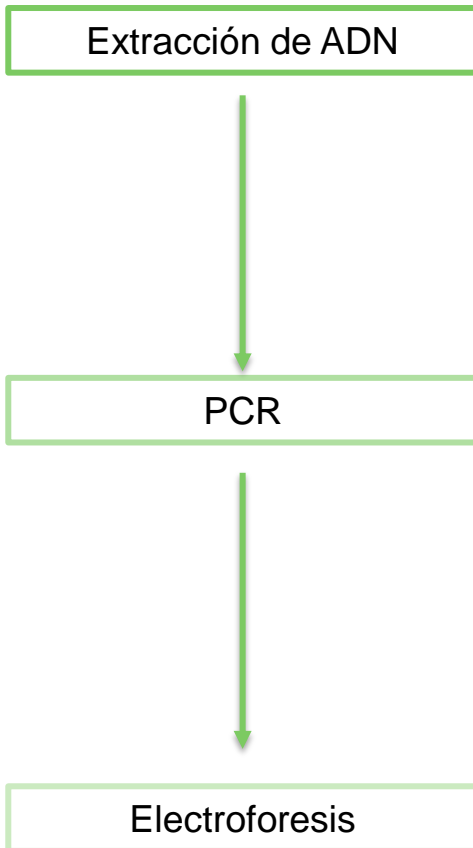
Khalajabadi SS y Molina E (2012) (2015)

Las relaciones catiónicas se ven relacionadas con la fertilidad del suelo. En nuestro estudio se presentaron variaciones notables en los valores de estas relaciones. El antagonismo entre (Ca+Mg)/K, se relaciona con la variación de los elementos evaluados de manera individual.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2019)

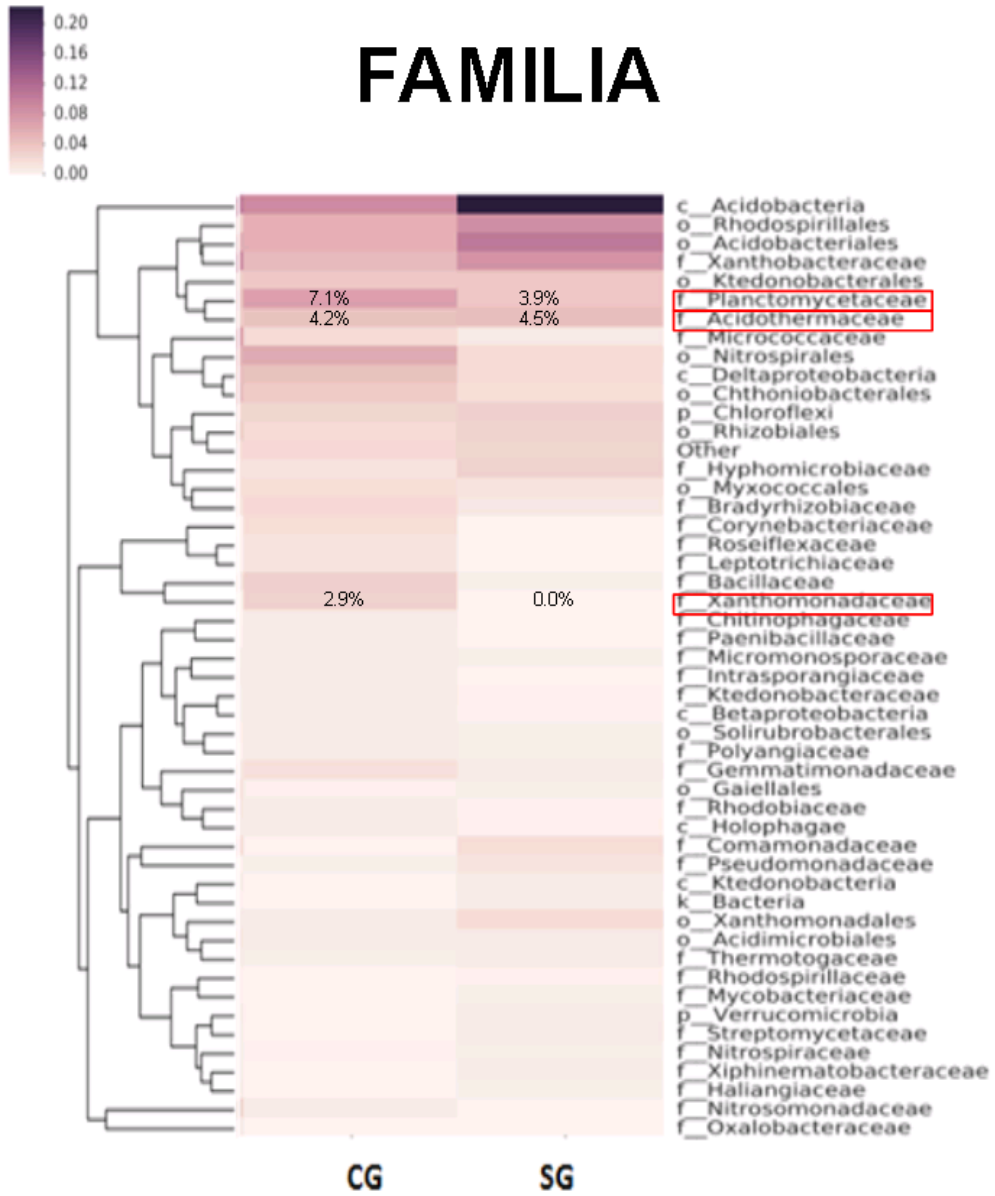
Esta constituida por diferentes residuos vegetales y animales que generan nutrientes para los microorganismos y plantas de la zona.

Fase 2: Extracción de ADN, PCR y Electroforesis



La electroforesis reveló que había buena cantidad de material genético para los procesos de secuenciación, por lo que fue posible enviarlo a ZymoBIOMICS®

FASE 3. Secuenciación de segunda generación



Planctomycetaceae

Esta familia presentó porcentajes altos en comparación con otras familias. Su presencia en los suelos se ve influenciada por la disposición de componentes del ciclo del nitrógeno (nitritos, nitratos o amonio) compuestos que se encuentran en alta concentración en los dos suelos analizados. principalmente con ambientes acuáticos, también se pueden presentar en tierra.

Francis CA et al. (2009)

Acidothermaceae

Se observa un porcentaje similar entre el suelo con glifosato y el suelo sin glifosato, relacionándolo con la cantidad de materia orgánica y pH ácido se podía observar aumento de esta familia y consecuentemente del género.

Plassart P et al. (2019)

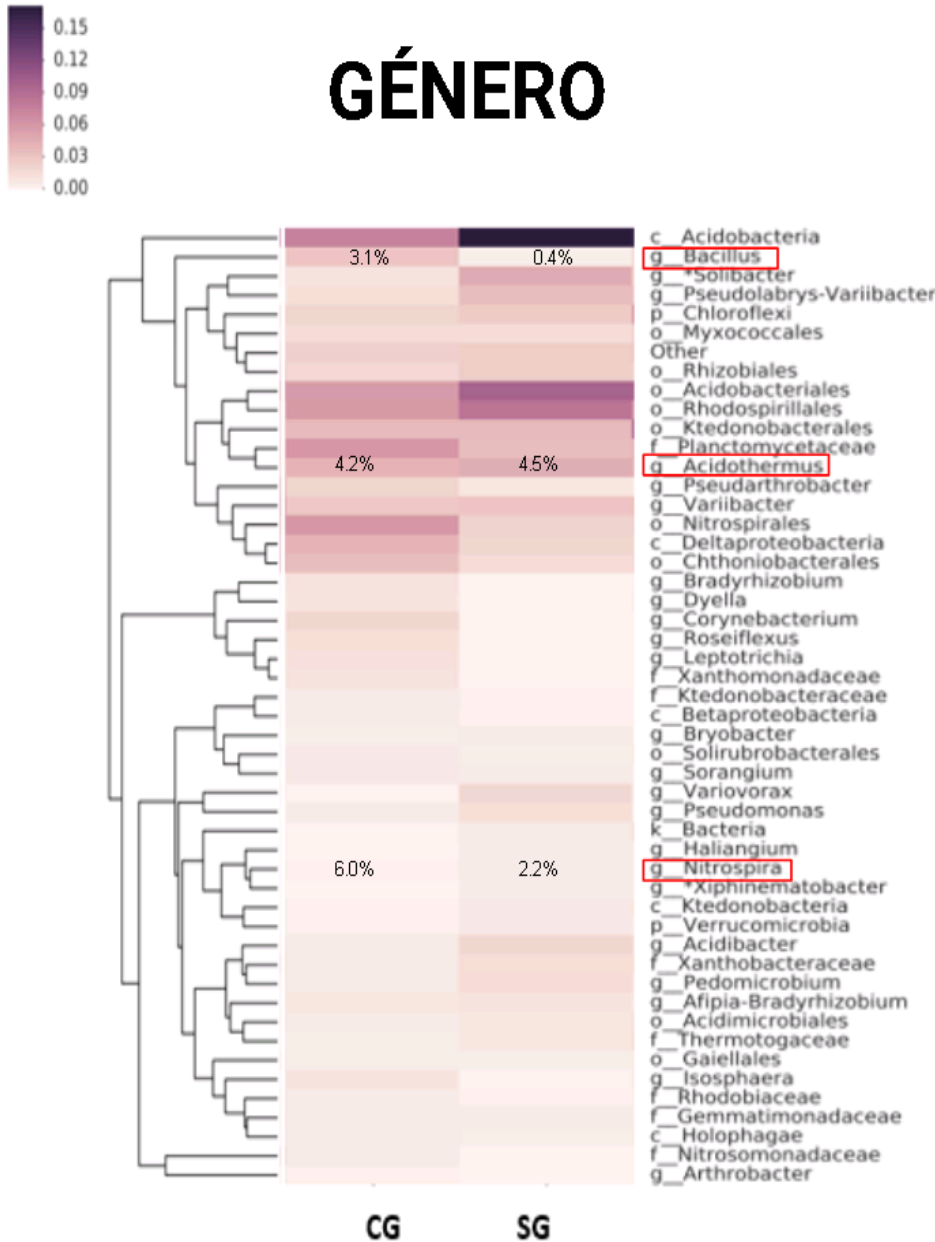
Xanthomonadaceae

De esta familia encontramos una alta presencia en los suelos con glifosato y agrícola, que difiere a lo encontrado en el suelo sin glifosato, situación que puede relacionarse con el pH ácido (4,6) del suelo.

Ren C, et al. (2016)
Wojnarowski et al. (2014)

FASE 3. Secuenciación de segunda generación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Bacillus

En el estudio se observa diferencia en la presencia de este género en los dos suelos analizados. La presencia de este género en mayor porcentaje en el suelo con glifosato que en el suelo sin glifosato, se puede deber a su capacidad de formación de esporas que le permite la supervivencia a ambientes hostiles.

Wolmarans K et al. (2014)

Acidothermus

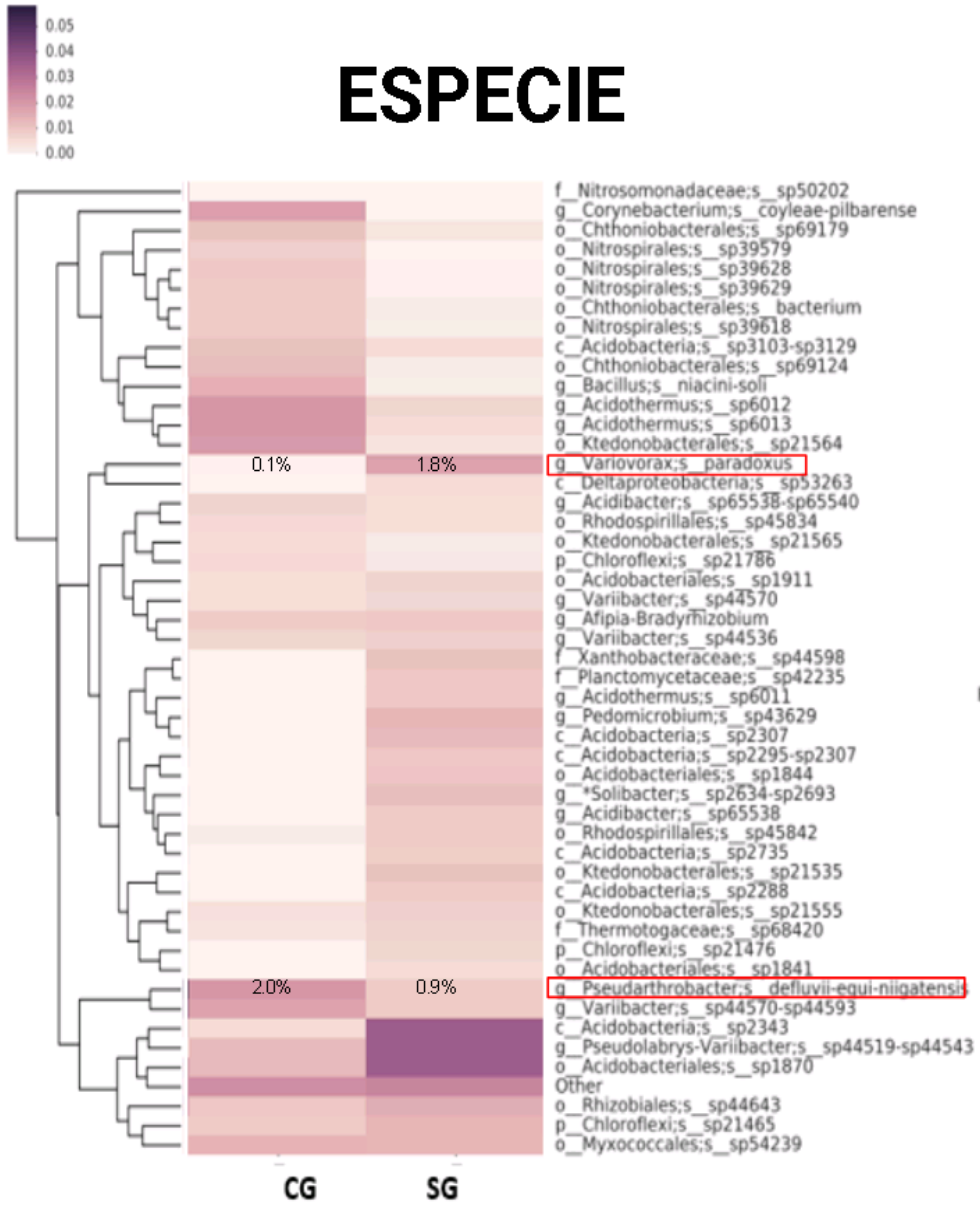
Los porcentajes encontrados en los dos suelos es similar, Este estudio que se compara con la familia Acidothermaceae determina que el grado de acidez, la presencia en el ambiente y el pH ácido del suelo. Este género es el único reportado para la familia Acidothermaceae.

Plassart P et al. (2019)

Nitrospira

Se observa presencia de este género en los suelos estudiados, relacionándose inicialmente con la adecuada concentración de nitrógeno en ambos suelos. También se observa un porcentaje más alto en el suelo con glifosato relacionándose con el pH del suelo, al cual este género es sensible.

Han S et al. (2017)



V. paradoxus

Han JI et al. (2011)

Esta especie se encuentra en los dos suelos analizados. En este estudio, se determinó que su metabolismo tiene aunque en general son bajos, se observa un mayor porcentaje en el suelo sin glifosato, lo que no se puede relacionar certeramente a alguna condición específica, por la poca información del microorganismo.

P. defluvii-equi-niigatensis

Busse H-J et al. (2018)

Los resultados de este microorganismo indican la presencia en los dos suelos, con un mayor porcentaje en el suelo con glifosato, lo cual se ha relacionado con el pH ambiente. Su género se caracterizaba como *Arthrobacter* antes del año 2016, del suelo, que si bien es ácido se encuentra cercano al rango de pH óptimo para su crecimiento (6-9).

1

En el análisis metagenómico se logró identificar la diversidad procariota de las muestras de suelo en la zona de amortiguación del Parque Nacional Natural Paramillo, en Córdoba, para lo cual se obtuvo que el filo más predominante fue Proteobacterias, el orden Rhizobiales, la familia Planctomycetaceae, el género *Acidothermus* y *Nitrospira* y finalmente a nivel de especie *defluvii-equi-niigatensis*.

2

Las propiedades físico químicas tales como pH, materia orgánica, carbono orgánico y nutrientes, tienen un alto impacto sobre las diferentes comunidades procariotas halladas, debido a que de dichas propiedades depende el crecimiento, desarrollo, actividad, metabolismo, resistencia o sensibilidad de los diversos microorganismos presentes en los suelos con y sin glifosato.



3

Se determinó mayor cantidad de microorganismos procariotas en el suelo sin glifosato, las OTUs obtenidas en dicho suelo duplicó las contenidas en el suelo con aplicación de glifosato, por ende se encontró un mayor porcentaje en los filo, clase, orden, familia y género de este suelo, a excepción de las *Actinobacterias*, quienes se presentaron en mayor cantidad en el suelo con glifosato. Lo anterior evidencia un impacto negativo en las comunidades procariotas del suelo cuando son expuestas al glifosato, disminuyendo su presencia en los suelos analizados en este trabajo.



Hacer uso correcto de las concentraciones establecidas por el Instituto Colombiano Agropecuario para el uso del glifosato, con el fin de evitar la contaminación de fuentes hídricas y la sobreexposición de la persona que lo manipule.



Utilizar el glifosato siguiendo las recomendaciones establecidas en la etiqueta del producto. Por ejemplo, hacer uso del equipo de protección personal al momento de la manipulación del producto y no reutilizar el envase del mismo con fines de actividades diarias (almacenamiento de agua o alimentos).



Buscar nuevos métodos que sirvan como alternativa para la erradicación de cultivos ilícitos y el aseguramiento de los cultivos lícitos.



Debido a la gran diversidad de suelos que se encuentra en el territorio colombiano, se recomienda que las diferentes instituciones gubernamentales, universitarias e institutos de interés ambiental, promuevan la investigación de la interacción del glifosato en otros tipos de suelos y ambientes.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca



Mg. Ligia Consuelo Sánchez

Grupo CEPARIUM – Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

PhD. Martha Lucia Posada

Grupo CEPARIUM – Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca



Agustín Hernández

Propietario Finca Tuti Fruti, agroecológica y ecoturística. Vereda Tuis Tuis, Tierralata, Córdoba.



Luis Ángel Canchila Salazar

Habitante de la región.



Nuestras familias

- Hernandez Leon R, Velazquez Sepulveda I, Orozco Mosquera M, Santoyo G. Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. Rev Int BOTÁNICA Exp [Internet]. 2010;(79):133-139 [Consultado 13 Ene 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572010000200004
- Kielak AM, Barreto CC, Kowalchuk GA, van Veen JA, Kuramae EE. The ecology of Acidobacteria: Moving beyond genes and genomes. Front Microbiol [Internet]. 2016;7(MAY):1-16 [Consultado 5 Abr 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4885859/pdf/fmicb-07-00744.pdf>
- Rampelotto PH, de Siqueira Ferreira A, Barboza ADM, Roesch LFW. Changes in Diversity, Abundance, and Structure of Soil Bacterial Communities in Brazilian Savanna Under Different Land Use Systems. Microb Ecol. 2013;66(3):593-607.
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, et al. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 2007;71(3):495-548 [Consultado 5 Abr 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2168647/pdf/0005-07.pdf>
- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of. Am SocMicrobiol [Internet]. 2016;80(1):1-43 [Consultado 5 Abr 2019]. Disponible en: <https://mmbr.asm.org/content/mmbr/80/1/1.full.pdf>
- Ortiz-Reyes A, Giraldo-Jaramillo TM, Moreno-Herrera CX. Análisis molecular de las bacterias asociadas a los depósitos de desechos de Atta cephalotes (Hymenoptera: Formicidae). Rev Colomb Entomol [Internet]. 2016;42(2):162-170 [Consultado 5 Abr 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v42n2/v42n2a09.pdf>
- Thomas F, Hehemann JH, Rebuffet E, Czjzek M, Michel G. Environmental and gut Bacteroidetes: The food connection. Front Microbiol [Internet]. 2011;2(MAY):1-16 [Consultado 5 Abr 2019].
- Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3129010/pdf/fmicb-02-00093.pdf>