

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA FORESTAL Y MEDIO
AMBIENTE



**Identificación molecular de bacterias de agua residual agrícola
aisladas en medio de cultivo con glifosato**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Ingeniero Forestal y del Medio
Ambiente**

Presentado por:

Raisa Keterine Orejuela Farromeque

Tumbes - Perú

2021

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA FORESTAL Y MEDIO
AMBIENTE



**Identificación molecular de bacterias de agua residual agrícola
aisladas en medio de cultivo con glifosato**

Tesis aprobada en forma y estilo por:

MSc. Jalmer Fidel Campaña Olaya (Presidente)

Dr. Gerardo F, Cruz Cerro (Secretario)

Msc. Víctor, Guzmán Tripul (Vocal)

Tumbes – Perú

2021

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA FORESTAL Y MEDIO
AMBIENTE



**Identificación molecular de bacterias de agua residual agrícola
aisladas en medio de cultivo con glifosato**

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y forma:

Bach. Raisa Orejuela Farromeque (Autor)

Dr. Ramón García Seminario (Asesor)

MSc. Rosa L. Solís Castro (Co-Asesor)

Tumbes – Perú

2021

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento el cual es muy importante en mi formación profesional.

A la Familia Orejuela Farromeque quienes me brindan siempre su apoyo y palabras de aliento para evitar decaer, brindándome con ello su compañía incondicional y alentándome siempre de una u otra manera para seguir con mis ideales

A mi hermosa hija Patricia Alexandra por ser fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, le doy gracias a Dios, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias.

A los Docentes Ramón García Seminario y a la M.sc. Rosa Liliana Solís Castro, por sus orientaciones y en la conducción de este trabajo, su paciencia y por ser partícipes de mi formación en el campo de la investigación.

A los miembros del grupo del departamento de Plant Biotec de la empresa Inca'Biotec por su apoyo, paciencia y enseñanzas en cada uno de los días que pasé realizando mi proyecto de tesis, así mismo a la empresa Inca'Biotec por todas las facilidades que me brindaron, sin las que no hubiera sido posible la ejecución de este trabajo

A los docentes de la Escuela de Ingeniería Forestal y Medio Ambiente por su guía y enseñanza, porque sin ayuda de ellos no habría podido elegir este tema y seguir mejorando en esta especialidad.

A mis compañeros Mack García y Cesar Mogollón por el apoyo mutuo en el desarrollo de esta tesis de investigación.

INDICE

DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTO	2
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	9
II. REVISIÓN DE LITERATURA	11
2.1. Bases teóricas.	11
2.1.1. Agua residual	11
2.1.2. Plaguicidas.....	11
2.1.3. Glifosato-Efectos fisiológicos.....	12
2.1.4. Contaminación agrícola.....	13
2.1.5. Biorremediación	13
2.1.6. Identificación de microorganismos por técnicas moleculares.....	14
2.2. Antecedentes.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Ubicación del Área de estudio.....	21
3.2. Metodología	22
3.2.1. Fase de campo.....	22
3.2.2. Fase de laboratorio	23
3.2.2.1. Caracterización fisicoquímica del agua residual.....	23
3.2.2.2. Análisis molecular de las bacterias cultivables.....	24
a) Aislamiento de bacterias cultivadas	25
b) Caracterización Morfológica	25
c) Identificación molecular de las bacterias cultivables	26
- Extracción de ADN.....	27
- Cuantificación de ADN.....	27
- Amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ...	28
- Electroforesis	29
- Secuenciación y análisis informático.....	30
3.2.2.3. Evaluación in vitro del crecimiento de bacterias en diversas concentraciones de glifosato.....	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1. Análisis físico-químico del agua residual Agrícola.....	32
4.2. Caracterización morfológica de bacterias del agua residual agrícola.....	33

4.3. Evaluación in vitro del crecimiento de bacterias en diversas concentraciones de glifosato.	35
4.4. Identificación molecular de las bacterias aisladas	37
V. CONCLUSIONES.....	41
VI. RECOMENDACIONES	41
VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	42
VIII. ANEXOS	51
Anexo 1. Composición química de medios de cultivos selectivos	51
Anexo 2. Secuencias de las bacterias identificadas	52
Anexo 3. Galería de Fotos.....	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Posición global satelital del lugar de muestreo y recolección de agua residual agrícola	21
Figura 2. Recolección de muestras de agua residual agrícola	22
Figura 3. Flujograma de trabajo para el aislamiento, mantenimiento y ensayo de microorganismos benéficos.	24
Figura 4. Extracción de ADN de bacterias aisladas de agua residual agrícola	28
Figura 5. Cuantificación de ADN extraído de bacterias aisladas de agua residual agrícola.....	28
Figura 6. Visualización de los amplicones de fragmentos del ADN de bacterias aisladas de agua residual agrícola.....	29
Figura 7. Representación de los círculos concéntricos mostrando el área de la corona circular.	31
Figura 8. (A) Morfología y (B) tinción Gram negativa de bacterias aisladas en medio de cultivo MSM suplementado con glifosato.	35
Figura 9. Crecimiento in vitro de la cepa bacteriana R14 en medio MSM suplementado con tres concentraciones de glifosato.....	36
Figura 10. Prospección de campo para recabar información sobre el uso de glifosato en la actividad agrícola.....	62
Figura 11. Aislamiento in vitro de bacterias presentes en el agua residual agrícola	62
Figura 12. (A) Extracción de ADN de bacterias aisladas del agua residual agrícola (B) cuantificación de ADN bacteriano.....	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización físico-químico del agua residual agrícola	23
Tabla 2. Características morfológicas evaluadas en las bacterias aisladas de agua residual agrícola.	26
Tabla 3. Caracterización Físico-química del agua residual agrícola en drenes de tres sectores muestreados.	33
Tabla 4. Descripción de la morfología colonial y celular de los aislados bacterianos sembrados en medio de cultivo MSM suplementado con GP.	34
Tabla 5. Crecimiento de los aislados bacterianos en medio MSM suplementado con diferentes concentraciones de GP.	36
Tabla 6. Identificación molecular de bacterias de agua residual agrícola, aisladas en medio MSM con glifosato, mediante secuenciación del ARNr 16S.	37

RESUMEN

El glifosato es uno de los herbicidas comúnmente utilizado en la agricultura para la erradicación de malezas; su aplicación trae como consecuencia impactos negativos en los seres vivos y el ambiente. La presente investigación tuvo como objetivo, identificar molecularmente las bacterias de agua residual agrícola aisladas en medio mineral mínimo suplementado con 0.5 gl^{-1} de glifosato (Solución madre: formulación comercial Roundup® 480 gl^{-1}). Se obtuvieron 14 cepas bacterianas, las mismas que se caracterizaron morfológicamente, tanto a nivel de colonia como celular. Posteriormente, estas bacterias fueron crecidas en el medio de cultivo MSM con concentraciones de 1, 2 y 3 gl^{-1} de glifosato. Todas las bacterias crecieron en el medio de cultivo MSM suplementado con 1 gl^{-1} de glifosato, destacando por su mayor diámetro y área circular aquellas codificadas como R7, R11, R12, R13, R15 y R16; mientras que con concentración de 2 gl^{-1} de glifosato sobresalieron las cepas R13 y R7. Asimismo, en la concentración de 3 gl^{-1} de glifosato tuvieron el mayor crecimiento las bacterias R13 y R8; en tanto que, las cepas R1, R2, R3, R4, R7, R12, y R16 no lograron sobrevivir. La identificación mediante la secuencia parcial del gen rARN 16S, dio como resultado 12 especies bacterianas pertenecientes al género *Pseudomonas* y 2 especies de *Klebsiella*. Todas las bacterias demostraron un gran potencial de tolerancia al herbicida glifosato.

Palabras clave: Agua residual agrícola, glifosato, bacterias, Medio MSM.

ABSTRACT

Glyphosate is one of the herbicides commonly used in agriculture for weed eradication; its application results in negative impacts on living beings and the environment. The objective of this research was to molecularly identify the bacteria from agricultural wastewater isolated in minimal mineral medium supplemented with 0.5 g l⁻¹ of glyphosate (Stock solution: commercial formulation Roundup® 480 g l⁻¹). 14 bacterial strains were obtained, the same ones that were characterized morphologically, both at the colony and cellular level. Subsequently, these bacteria were grown in the MSM culture medium with concentrations of 1, 2 and 3 g l⁻¹ of glyphosate. All the bacteria grew in the MSM culture medium supplemented with 1 g l⁻¹ of glyphosate, highlighting those encoded as R7, R11, R12, R13, R15 and R16 due to their larger diameter and circular area; while with a concentration of 2 g l⁻¹ of glyphosate, strains R13 and R7 stood out. Likewise, in the concentration of 3 g l⁻¹ of glyphosate the bacteria R13 and R8 had the highest growth; whereas, the strains R1, R2, R3, R4, R7, R12, and R16 did not survive. Identification through the partial sequence of the 16S rRNA gene, resulted in 12 bacterial species belonging to the genus *Pseudomonas* and 2 species of *Klebsiella*. All bacteria showed great potential for tolerance to the herbicide glyphosate.

Keywords: Agricultural wastewater, glyphosate, bacteria, MSM medium.

I. INTRODUCCIÓN

El sector agrícola en el Perú es una de las principales actividades de producción en el país, cuya superficie sembrada es de 1 441 143 has, siendo el arroz uno de los primordiales cultivos, ocupando un área de 303 972 has (INEI, 2018) que representa el 6% del PBI (MINAGRI, 2015). Su modalidad de cultivo es intensiva durante todo el año, especialmente en la región norte, donde se utilizan ingentes cantidades de pesticidas para proteger al cultivo de los insectos plagas, patógenos y malas hierbas, convirtiendo al Perú en uno de los principales países latinoamericanos importadores de estos insumos (Castro, 2017).

En la región de Tumbes se cultiva alrededor a 46 465,40 has de arroz (GORE, 2015), constituyendo un modelo de producción agrícola prevalente en el uso intensivo de agroquímicos (Buenos & Luciano, 2018). El drenaje de las aguas residuales procedentes de la actividad arrocera contiene una gran cantidad de estos compuestos de diversa naturaleza que finalmente son vertidos a los esteros con el consiguiente desequilibrio de estos ecosistemas.

El glifosato (con diversos nombres comerciales) es uno de los principales herbicidas que se usa para controlar las malas hierbas en el cultivo de arroz, debido a su eficacia y bajo costo (Ouided & Abderrahmane, 2013). Este producto ha sido catalogado como de alto riesgo, debido a su alta toxicidad para la salud de los seres vivos y los ecosistemas naturales, principalmente los suelos y masas de agua (OMS & FAO, 2014). Investigaciones realizadas en distintos países han determinado que el glifosato afecta la fertilidad del suelo y a las comunidades vegetales nativas y cultivadas (Allegrini, Gomez, and Zabaloy 2017; Newman et al. 2016; Paravani et al. 2016; Yu et al. 2015).

Sin embargo, es sabido que los sitios contaminados con cierta cantidad de agroquímicos proveen nutrientes para la proliferación de ciertos microorganismos que poseen mecanismos fisiológicos para desarrollar resistencia, adaptabilidad y capacidad de degradación y/o desarrollo en suelos y aguas contaminadas, (Celaya & Castellanos, 2011; Galati & Clark, 2011; Bento et al., 2016; Melo et al., 2016; Newman et al., 2016; de Alencar et al., 2017; Fu et al., 2017; Cecilia & Maggi, 2018; Wang et al., 2018; Ramakrishnan et al., 2019), tal es el caso de bacterias que crecen en suelos con alto contenido de glifosato, *Burkholderia vietnamiensis* strain AQ5-12 (Manogaran et al., 2018), *Bacillus subtilis* (Yu et al., 2015), *Pseudomonas spp.* strain. 170 (Zhao et al., 2015). Por lo que, estos microorganismos podrían ser una alternativa viable y sostenible en la restauración de los ecosistemas afectados, como es el caso de las aguas residuales agrícolas.

En los últimos años el uso de biología molecular mediante estudios genómicos aplicada a los microorganismos, está jugando un rol importante en su identificación de una manera más precisa, confiable y en menor tiempo en comparación con las técnicas microbiológicas tradicionales. La información relacionada con la microbiota de aguas residuales agrícolas conteniendo el herbicida glifosato en el Perú es escasa; por lo que en esta investigación tuvo como objetivo identificar molecularmente las bacterias del agua residual agrícola aisladas en medio de cultivo con glifosato.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Bases teóricas.

2.1.1. Agua residual

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) menciona que el agua residual es aquella agua que no tiene valor inmediato para el fin para el que se utilizó ni para el propósito para el que se produjo debido a su calidad, cantidad o al momento en que se dispone de ella. Por ello se considera que las aguas agrícolas son un tipo de agua residual, debido a que su calidad inicial se vio afectada después de un determinado uso. Además, al ser aguas contaminadas con agroquímicos utilizados en esta actividad, estas aguas al ser desechadas causan efecto negativo a los diversos ecosistemas (ecosistemas acuáticos, ecosistemas costeros), fauna, flora y el suelo (Bento et al., 2016; Allegrini et al., 2017; Sasal et al., 2017). Estas aguas no tratadas no son aptas para su reutilización, debido a que presentan en su composición agentes biológicos, físicos y químicos, siendo este último derivado de los agroquímicos aplicados en el desarrollo de la producción primaria, causando con ello la eutrofización de las aguas en muchos casos (Solange, 2011).

2.1.2. Plaguicidas

Según el artículo 2° del código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas FAO un plaguicida es “Cualquier mezcla de sustancias destinadas a prevenir, erradicar o controlar cualquier plaga que causan perjuicio o que interfieren de cualquier forma en la producción de productos agrícolas”, además de que pueden ser administrados en animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos (FAO, 2013 citado por Losada, 2004).

2.1.3. Glifosato-Efectos fisiológicos

El glifosato (N- (fosfometil) glicina) es un herbicida que corresponde a un ácido orgánico débil formado por una molécula de amplio espectro, no selectivo y post emergente, cuya fórmula empírica es $C_3H_8NO_5$ de glicina y otra de fosfometilo, su forma física es un polvo cristalino, blanco e inodoro, con un peso específico de 1.704, soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos, no tiene volatilización significativa, Así mismo, Steinrucken & Amrhein (1984) mencionan que el herbicida glifosato es no selectivo y de amplio espectro [N- (fosfometil) glicina], además, de ser un potente inhibidor de 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato (EPSP), enzima vital para el proceso de síntesis de aminoácidos aromáticos provenientes de las plantas (Selvi et al., 2011).

Este herbicida fue desarrollado por la empresa Monsanto a principios de la década de 1970, descubierto por el doctor John E. Franz e introducido al mercado en 1974 para la erradicación de malezas y pastos de hoja ancha como por ejemplo, gramíneas, arbustos y árboles, entre otros (Solange, 2011). Además del control de plagas y la erradicación de cultivos ilícitos en países que trafican droga, autores como Calderon et al. (2019). (Bento et al., 2016), Manogaran et al. (2018), (Mesnage et al., 2015), Newman et al. (2016), Wang et al. (2016), mencionan que, el uso excesivo de este pesticida en el campo agrícola ha llevado a la acumulación de plaguicidas en el suelo, causando varios efectos adversos. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2013) señala también que este pesticida es comúnmente utilizado debido a que destaca por su eficiencia en diversos cultivos y por su bajo costo.

Sin embargo, la toxicidad de los herbicidas en los ecosistemas y la disipación a partir de microorganismos ha sido ampliamente investigada (Allegrini et al., 2017; Paravani et al., 2016; Sviridov et al., 2015; Zhang et al., 2018), determinándose los daños en plantas, animales, ambiente y la salud humana (Varona et al. 2009). También se han planteado preocupaciones de que el glifosato puede modificar los ecosistemas del suelo y las comunidades

microbianas (Nguyen et al., 2018).

Por otro lado, Defarge et al. (2016) encontraron que los herbicidas a base de glifosato interrumpen la actividad de la aromatasa en las células humanas, causando impactos negativos en la salud (Chang & Delzell 2016). Además, Mesnage et al. (2015) determinaron que la exposición al GP causa efectos tóxicos potenciales. Kim et al. (2016), realizaron un estudio basado en factores pronósticos de pacientes que estuvieron en contacto con el glifosato-surfactante, determinando que, a partir de curvas característica operativa del receptor (ROC) y curva de supervivencia de 30 días de Kaplan-Meier de 232 pacientes analizados, 29 murieron, lo que arroja una tasa de letalidad del 12.5%. También se ha planteado alguna preocupación en cuanto a que el glifosato podría alterar los ecosistemas edáficos y las comunidades microbianas Nguyen et al. (2018).

2.1.4. Contaminación agrícola

La contaminación agrícola está dada por el uso indebido de sustancias químicas en la producción primaria, donde se utilizan tratamientos específicos para el sembrío y mantenimiento de cultivos, conllevando posteriormente a una contaminación gradual en suelos, aguas y ecosistemas costeros (Puente et al. 2015), impactando a su vez a diversos microorganismos que ayudan a la fertilidad del suelo como es el caso de las bacterias del género *Acidobacter* (Vera et al., 2012; Sviridov et al., 2015; Zhao et al., 2015; Dewar, 2018; Huang et al., 2018; Wang et al., 2019).

2.1.5. Biorremediación

La Academia Americana de Microbiología menciona que, la biorremediación es el “uso de organismos vivos para reducir o eliminar riesgos medioambientales resultantes de la acumulación de compuestos químicos tóxicos y otros residuos peligrosos” siendo esta posible gracias al potencial metabólico de los microorganismos donde se cataliza, destruye o

transforman compuestos químicos en otros de menor impacto que resultan amigables para la naturaleza (Humberto & Rojas, 2011; Guarico & Lara, 2012; Nwinyi et al., 2016; Pulamarín & Oña, 2019). Sin embargo, es necesario tener en cuenta, que existen factores limitantes para el crecimiento de los microorganismos, como nutrientes esenciales (nitrógeno y fósforo) y las condiciones medioambientales apropiadas (pH, potencial redox, humedad), que ponen en riesgo la existencia de poblaciones microbianas con potencial enzimático (Celaya & Castellanos, 2011; Guijarro et al., 2018).

2.1.6. Identificación de microorganismos por técnicas moleculares

Rodicio (2016) menciona que la identificación de microorganismos ha sido realizada por una variedad de técnicas comúnmente desarrollada a nivel microbiológico basados en pruebas bioquímicas. Sin embargo, hoy en día, se utilizan técnicas de identificación más sensibles y eficaces que permiten una identificación mucho más rápida y confiable. Por ello, el uso de Biología molecular proporciona técnicas importantes que utilizan la secuenciación parcial de fragmentos del gen ribosomal 16S, realizando la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual fue desarrollada por Mullis (1990), la secuenciación de los nucleótidos en la amplificación de ampliaciones es analizada por la secuencia en el Programa bioinformático BLAST, donde se utilizan una base de datos para la identificación de organismos.

Para la amplificación del fragmento se utiliza un termociclador, cuyo proceso se desarrolla en 35 ciclos y se basa en tres etapas, la primera es desnaturalización la cual realiza la separación de las cadenas complementarias de ADN, se realiza a una temperatura de 92 – 98 °C en un tiempo prolongado de 30 a 90 segundos. La segunda etapa es hibridación la cual a su vez consiste en el apareamiento entre los oligonucleótidos y la cadena del ADN desnaturalizado, hibridando con su secuencia complementaria se desarrolla en un tiempo de 30 o 60 segundos a una

temperatura de 50 ó 60 °C. Por último, la etapa de extensión, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La Taq polimerasa sintetiza a la nueva cadena en dirección de 5' a 3'. Esta etapa reacciona a una temperatura de 70 o 74 °C con un tiempo de 30 a 90 segundos (Rodicio & Mendoza, 2004).

La amplificación de Nucleótidos es visualizada a partir de la electroforesis, para ello es necesario la preparación de geles de agarosa al 1,5 g por cada 100 ml de TAE al 1X, el tamaño de banda depende del peso molecular específico y es comparado con un marcador de peso molecular para determinar el número de pares de bases, producto de la PCR, (Roth, 2019).

Para el análisis de la Secuencia es necesario la comparación de la secuencia del gen 16S ARNr; analizando el grado de identidad y similitud entre secuencias biológicas de proteínas y nucleótidos ya reportadas. Sin embargo, es necesario resaltar que existen diversas fuentes de bases de datos que brindan mayor confiabilidad.

2.2. Antecedentes

Son muchos los reportes sobre las bondades que ofrecen los microorganismos benéficos en la restauración de diversos ecosistemas generando tecnología limpia. Yelena et al. (2013) establecieron que las cepas aisladas de la rizósfera son capaces de desarrollar funciones benéficas a partir la promoción de crecimiento, y también pueden desarrollar funciones degradativas a partir del glifosato. Estos mismos investigadores realizaron un estudio de aislamiento y caracterización de cepas rizosféricas, aislando 10 cepas del rizoplasma de varias plantas, las cuales fueron resistentes a una concentración de glifosato de 10 mM, siendo una de estas cepas identificadas *E. cloacae* K7, la cual pudo utilizar al glifosato como fuente de P (fosforo).

En lo que respecta al uso de microorganismos con resistencia y capacidad

de degradar glifosato, se han reportado algunos estudios, que evaluaron la actividad de biodegradación al glifosato, a partir del aislamiento de microorganismos nativos, demostrando que, al usar este producto como fuente de carbono, fósforo y azufre la degradación resultó más eficiente (Ebenau et al., 2017; Fu et al., 2016; Guijarro et al., 2018; Tazdaït et al., 2018; Yu et al., 2015;; Zhang et al., 2018; Zhao et al., 2015)

Fu et al. (2016), realizaron un ensayo de mutación para obtener cepas con alta capacidad de degradación del glifosato y mejorar la eficiencia de la enzima degradadora del glifosato, mediante la optimización de las condiciones de fermentación, donde la spora de *Aspergillus oryzae* A-F02 se sometió a mutagénesis ultravioleta. El experimento de factor único y la metodología de superficie de respuesta se utilizaron para optimizar la producción de enzimas degradadoras de glifosato a partir de la cepa mutada mediante fermentación en estado líquido. Se obtuvieron cuatro cepas mutantes proporcionando la actividad enzimática total.

Así mismo Manogaran et al. (2018); Manogaran, Shukor, et al. (2018) estudiaron la capacidad que presentan los microorganismos al usar productos químicos, donde identificaron las bacterias *Burkholderia vietnamiensis* AQ5-12 y *Burkholderia sp* AQ5-13 con potencial de usar el glifosato como fuente de fósforo para apoyar la reducción del molibdeno. Los resultados indicaron a 5 mM de fosfato como la concentración óptima que soporta la reducción de molibdeno para ambas bacterias.

Sin embargo, Argüello-Rangel et al. (2015), Brunharo et al. (2019), Ebenau-Jehle et al. (2017), reportaron los primeros casos de resistencia al glifosato asociado tanto a la duplicación de EPSPS (enzima producida por plantas y microorganismos, señalando también que la mutación del sitio objetivo en la posición 106, conlleva a altos niveles de resistencia al glifosato. Cabe mencionar que poblaciones microbianas puede ser utilizadas en consorcios con fines de tratamiento y biorremediación de sitios que han sido críticamente impactados por contaminantes, como sucede en los consorcios de microalgas con potencial de biorremediación de aguas residuales a partir

de Metagenómica (Posso, 2019).

Allegrini et al. (2017), realizaron un estudio de laboratorio a nivel de microcosmos para evaluar el impacto de hasta tres aplicaciones de GP en las comunidades microbianas, relacionando la exposición repetida al glifosato y los cambios que inducen en la nitrificación de las comunidades y el metabolismo de los fenilpropanoides, determinando que la exposición de GP en el suelo causa impactos en los procesos claves para el ciclo del C y N en el suelo.

Paravani et al. (2016), aislaron y caracterizaron morfológicamente bacterias anaeróbicas con potencial de producir metano utilizando al GP como fuente de energía. Del mismo modo, Tazdaït et al. (2018), realizaron un estudio cinético sobre la biodegradación del glifosato con lodos activados no climatizados, probándose el crecimiento celular a diferentes concentraciones de glifosato (0.1, 0.5, 1, 2 y 5 g / L).

Fu et al. (2017) mencionan la vía y paso limitante de *Aspergillus oryzae* en la degradación del glifosato. Para ello, de la aireación de un tanque en una fábrica de pesticidas se aisló *Aspergillus oryzae* A-F02, un hongo que degrada el glifosato. La vía y el paso limitante de la velocidad del glifosato (GP) se investigó mediante análisis de metabolitos. El glifosato, aminometilfosfónico ácido (AMPA) y metilamina estuvieron presentes en el líquido de fermentación de *A. oryzae* A-F02. La vía de degradación de GP en *A. oryzae* A-F02 se reveló: GP se degradó primero en AMPA, que luego se degradó en metilamina. Finalmente, la metilamina se degradó aún más en otros productos, concluyendo que el descomponer el GP a AMPA es un paso fundamental en su degradación, siendo el AMPA el principal producto en la degradación del GP (Grandcoin et al., 2017).

Guijarro et al., (2018) evaluaron la disipación del GP en condiciones de campo en tres tipos de suelo, considerando los siguientes factores en la persistencia ambiental del herbicida, a) comunidades bacterianas del suelo, b) propiedades fisicoquímicas del suelo, c) exposición previa a la a herbicida.

Además, determinaron la concentración de GP y AMPA en función del tiempo. Asimismo, la dinámica de las comunidades bacterianas del suelo fue evaluada, mediante secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S, concluyendo que, todos los suelos mostraron cambios en la estructura de la comunidad bacteriana, que, sin embargo, no pudieron asociarse claramente con la disipación del glifosato, lo que sugiere la presencia de poblaciones de bacterias redundantes de degradadores potenciales. Sin embargo, la aplicación del herbicida provocó una interrupción parcial de la red de asociación bacteriana del suelo no expuesto.

la Cecilia & Maggi (2018) mencionan que la oxidación del herbicida glifosato (GLP) en el suelo puede sufrir tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. La oxidación biótica, degradación abiótica y dos reacciones enzimáticas oxidativas o hidrolíticas produce ácido aminometilfosfónico (AMPA), tanto el GP como el AMPA son fitotóxicos. Se hizo un estudio de degradación del GP en el microcosmo del suelo, diseñando varios análisis de sensibilidad para evaluar el potencial de degradación de GLP y AMPA contra la disponibilidad de O₂ (aq) y carbono (C), pH y contenido mineral de birnessita, demostrando que, las bacterias oxidan o hidrolizaban hasta el 98% de GLP y solo el 9% de AMPA.

Manogaran et al. (2017) mencionan que el glifosato [N- (fosfometil) glicina] es un herbicida desarrollado por la empresa Monsanto a principios de la década de 1970 para la erradicación de malezas y pastos de hoja ancha, donde a consecuencia del uso excesivo de este en el campo agrícola, ha llevado a la acumulación de plaguicidas en el suelo, causando varios efectos adversos. La preocupación por su toxicidad y la disipación a partir de microorganismos llevó a desarrollar un estudio de aislamiento de siete cepas microbianas de diferentes sitios contaminados con glifosato en Malasia. Como resultado, aislaron e identificaron cepas que pudieron crecer en un medio que contenía glifosato como única fuente de fósforo, las cuales fueron identificadas como *Burkholderia vietnamiensis* y *Burkholderia sp*,

Manogaran, Shukor, et al. (2018) mencionan que diferentes estudios

reportan problemas de salud al glifosato por su alto nivel de toxicidad, indicando además que, la remoción de este herbicida del medio ambiente, generalmente se realiza mediante un proceso microbiológico, ya que el proceso de degradación química es ineficaz debido a la presencia de enlaces muy estables.

Wang et al. (2016) reporta la remediación de suelos contaminados con glifosato mediante plasma de descarga de barrera dieléctrica a presión atmosférica y su evaluación de toxicidad residual. Se exploró la degradación del suelo y se analizó la toxicidad del lixiviado del suelo después de la remediación, evaluado mediante una prueba de germinación de semillas. Los resultados experimentales mostraron que aproximadamente el 93.9% del glifosato se degradó dentro de los 45 min del plasma del tratamiento DBD, con un rendimiento energético de 0.47 g kW/h, y el proceso de degradación encajó con el modelo cinético de primer orden. Asimismo, se evaluó una prueba de toxicidad de lixiviados del suelo, utilizando germinación de semillas de trigo, donde el suelo no mostró ningún efecto peligroso después de la degradación de alta eficiencia de glifosato.

Munees (2011) evaluó el efecto de cuatro herbicidas, quizalafop-p-etilo, clodinafop, metribuzina y glifosato, sobre las actividades que promueven el crecimiento de las plantas, como la solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, ácido indol acético, exopolisacáridos, cianuro de hidrógeno y la producción de amoníaco como tolerancia a estos herbicidas. Se utilizó la cepa *Klebsiella sp.* aislada de la rizósfera de mostaza. Los herbicidas seleccionados se aplicaron dos o tres veces a las dosis recomendadas, los resultados mostraron que, *Klebsiella sp.* cepa PS19 toleró una concentración de 1 600 µg/ml de quizalafop-p-etilo y clodinafop, 3 200 µg/ml y 2 800 µg/ml de metribuzina y glifosato, respectivamente. El estudio reveló, además, que las dosis más altas de los herbicidas disminuyeron la actividad de promoción de la planta, pero no inhibió completamente las actividades metabólicas de la cepa PS19.

Eschenburg et al. (2002) mencionan que la enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa (EC 2.5.1.19) es esencial para la

biosíntesis de compuestos aromáticos en plantas y microbios, y esta enzima es inhibida por el herbicida glifosato. Reportan que, una de las primeras enzimas mutadas e insensibles al glifosato es la Gly96Ala EPSP sintasa de *Klebsiella pneumoniae*.

Las pseudomonas son bacterias ubicuas que pueden vivir bajo una amplia gama de condiciones ambientales; y algunas especies se utilizan con éxito en la industria de la fermentación. Sun et al. (2018), determinaron que, la cepa *Pseudomonas plecoglossicida* es un importante productor de 2-cetogluconato industrial (2KGA), demostrando con ello la importancia del gen KguT de *P. plecoglossicida*.

Yu et al. (2015) indican que la cepa *Bacillus subtilis* es capaz de degradar al glifosato, presentando un alto potencial de biorremediación del suelo, debido a que esta cepa bacteriana pudo crecer en altas concentraciones de GP, siendo 40.000 mg /ml la concentración máxima tolerada.

Otros estudios relacionados a la capacidad de degradación de compuestos contaminantes que expresan los géneros *Pseudomonas* han sido reportados por (Tan et al., 2014; Yan et al., 2017; Geiger et al. 2019 Y. Sun et al., 2019; Grandcoin et al., 2017).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del Área de estudio

La obtención de muestras se realizó en los drenes correspondiente a los campos arroceros, ubicados entre los laterales B y C de la margen izquierda del rio Tumbes, colindantes con la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Tumbes, distrito de San Pedro de los Incas (Corrales), Provincia y Región de Tumbes, cuyas coordenadas en UTM son: 9603026.53 mS, 555 137. 77 mE y una altitud de 5 m s.n.m (Fig. 1).

PUNTOS DE MUESTREO DE AGUA RESIDUAL AGRICOLA, CORRALES- TUMBES

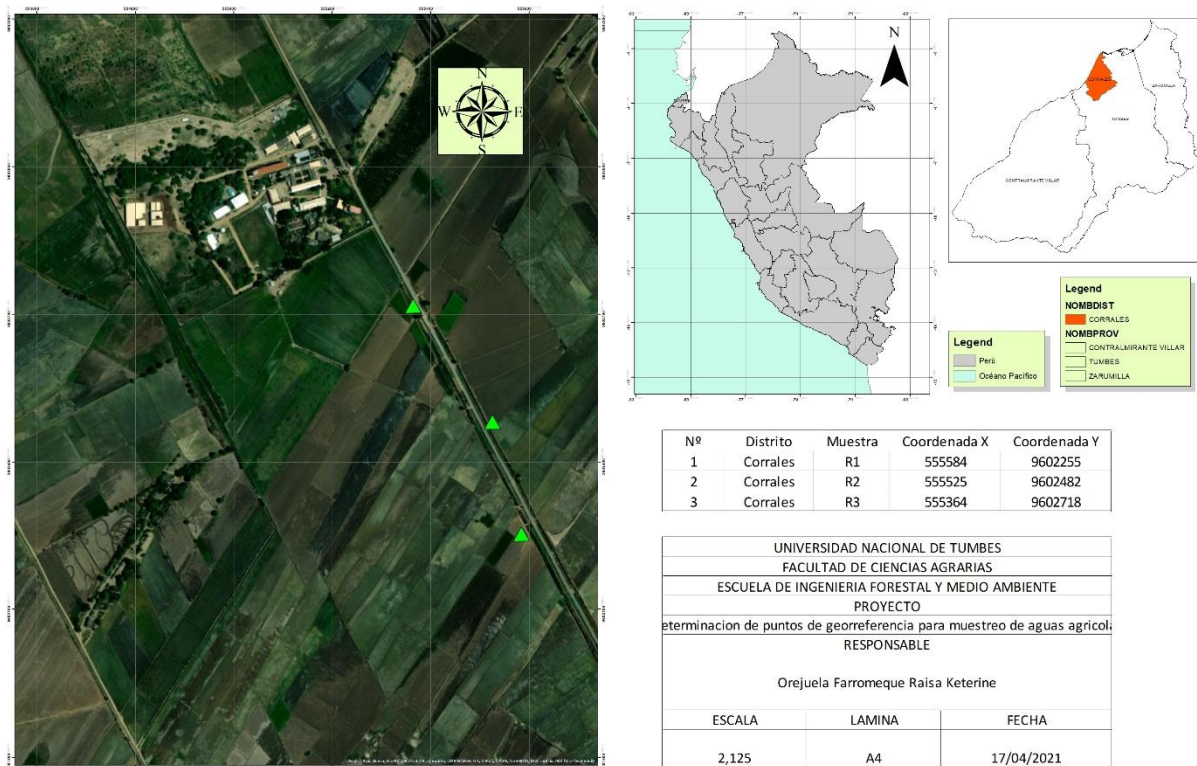


Figura 1. Posición global satelital del lugar de muestreo y recolección de agua residual agrícola

3.2. Metodología

La investigación abarcó dos fases:

3.2.1. Fase de campo

Se realizó una prospección para ubicar y seleccionar los drenes con agua residual agrícola a muestrear que, presentaron características relevantes en cuanto a su carga de contaminantes químicos, especialmente la deposición del herbicida glifosato (datos proporcionados por especialistas del Servicio Nacional de Sanidad Agraria-SENASA). En condiciones de bioseguridad y en botellas de vidrio con tapa rosca, previamente esterilizados, se tomaron dos submuestras en cada una de los tres puntos seleccionados (Figura 2), obteniéndose finalmente 6 muestras, las cuales fueron depositadas en una caja de poliestireno conteniendo Gel Pack (generando una temperatura estable de 4°C para su conservación) y posteriormente, trasladadas a los laboratorios de Ingeniería Forestal y Medio Ambiente de la Universidad Nacional de Tumbes (3 muestras) y Biología molecular de la Empresa INCA'BIOTEC (3 muestras) para su análisis físico-químico y estudio microbiológico y de identificación molecular, respectivamente.



Figura 2. Recolección de muestras de agua residual agrícola

3.2.2. Fase de laboratorio

3.2.2.1. Caracterización fisicoquímica del agua residual

Las muestras de agua residual agrícola de los tres puntos fueron analizadas en el laboratorio de Análisis Ambiental de la Universidad Nacional de Tumbes, determinándose los parámetros físico-químicos indicados en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización físico-químico del agua residual agrícola

Tipo de análisis	Parámetros	Unidad	Método analítico	Laboratorio
Físico	Aspecto	-	Organoléptico	Laboratorio de Análisis Ambiental
	Temperatura	°C	Sensor Térmico (electrónico)	
	pH	Unid. pH	Potenciométrico	
	O. D	mg/L	Electrométrico	
	C.E	dS/m	Electrométrico	
Química	S.D. T	ppm	Volumétrico	
	Nitritos	mg/L	Colorimétrico	
	Fosfatos	mg/L		
	DBO ₅	ppm	Dilución	

Para la determinación de los parámetros físicos indicados en la tabla 1 se utilizó el analizador multiparámetro (WTW modelo multi 3680). En tanto, que los parámetros químicos se realizaron, según la metodología de (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1999). La concentración de nitratos y fosfatos se determinaron por el método colorimétrico en un espectrofotómetro UV-VIS PerkinElmer, Lambda 365 a 443 nm de longitud de onda, respectivamente.

Par el análisis del DBO se realizaron diluciones de las muestras a 5/300, 10/300 y 15/300 en frascos Winkler, la lectura del oxígeno disuelto inicial y final se utilizó la técnica de electrodos de membrana con el uso del multiparámetro. Para la DBO₅ fue necesario preservar las diluciones a 20 °C ± 1°C durante 5 días, determinándose luego mediante la fórmula:

$$DBO_5 = \frac{(O_i - O_f) \times (1 - (0,01 \times P))}{(0,01 \times P)}$$

Donde:

O_i: Oxígeno disuelto inicial (mg/L)

O_f: Oxígeno disuelto final (mg/L)

P: Dilución en porcentaje

Cuando la dilución es 10/300

P= (5/300)*100

P= (10/300)*100

3.2.2.2. Análisis molecular de las bacterias cultivables

Como estrategia se utilizó el flujograma de trabajo establecido en el proyecto BioFort 1 modificado (Fig- 3)

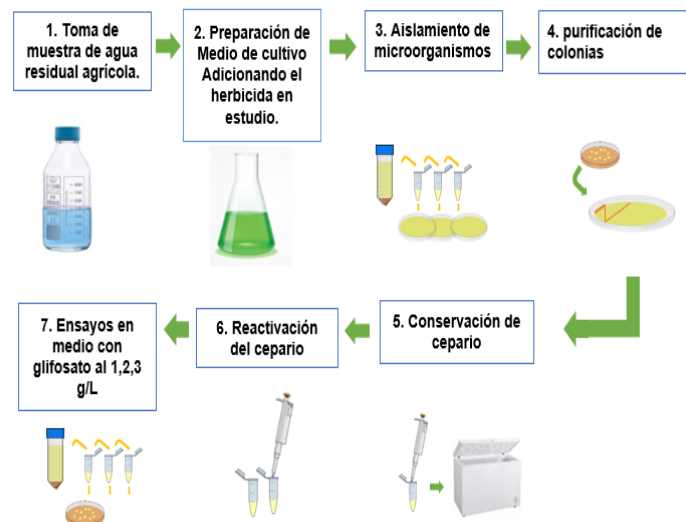


Figura 3. Flujograma de trabajo para el aislamiento, mantenimiento y ensayo de microorganismos beneficiosos.

Fuente: EIN-1-P021-17 informe del proyecto Bio-Fort1 modificado

a) Aislamiento de bacterias cultivadas

Para el aislamiento de los microorganismos del agua residual agrícola se utilizó el medio específico caldo mineral mínimo (MSM) (cuya composición se detalla en el anexo 1) suplementado con glifosato como única fuente de carbono a un pH de 7.1, y siguiendo el protocolo propuesto por (Manogaran et al., 2017; Yu et al., 2015; Zhao et al., 2015). En un frasco de botella de tapa rosca de 500 ml que contenía el medio específico MSM se adicionó 5 ml de agua residual agrícola y 0.5 gl^{-1} de glifosato (Solución madre: formulación comercial Ronduond®). La muestra se homogenizó en un agitador orbital GENIE TEMP-SHAKER300 a 180 rpm, incubándola a una temperatura de $33 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 días. Posteriormente, se realizó una transferencia de 5 ml de esta mezcla a un medio MSM fresco conteniendo 1 gl^{-1} de GP e incubándola a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 – 4 días en agitación constante a 180 rpm. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-7} en tubos eppendorf, se utilizaron las diluciones 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7} para el aislamiento bacteriano. Para gelificar el medio mínimo mineral, se añadieron 15 gl^{-1} de agar, adicionándose luego el glifosato a una concentración inicial de 0.5 gl^{-1} de cada dilución.

La siembra de las cepas bacterianas se realizó por triplicado en placas Petri conteniendo agar medio mínimo mineral, agregando $10 \text{ } \mu\text{l}$ de cada dilución y esparciéndolas con una espátula de Drigalsky. Estas placas Petri se mantuvieron en una incubadora a 28°C por 48 horas para propiciar el desarrollo de los microorganismos. Después de observar el crecimiento diferenciado de colonias bacterianas a partir de su morfología que éstas presentaban en MSM, se procedió a realizar tres purificaciones en el mismo medio de cultivo.

b) Caracterización Morfológica

Se utilizó las cepas bacterianas purificadas en medio mínimo mineral con glifosato, las cuales fueron incubadas a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, momento en que se evaluó las características morfológicas de las colonias y también se realizaron tinciones de Gram para el estudio de la morfología celular. La

morfología se evaluó directamente a través de visualizaciones de las colonias bacterianas, de acuerdo a lo sugerido por (Alvarado-cap & Guti, 2010), cuyos parámetros se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Características morfológicas evaluadas en las bacterias aisladas de agua residual agrícola.

Morfología	Parámetro	Descripción
Morfología de la colonia	Forma	Irregular, circular, rizado
	Margen	Ondulado, entero, lobulado, encrespado
	Elevación	Plana, elevada, cóncava
	Tamaño	Moderado, grande, pequeño, puntiforme
	Textura	Lisa, rugosa
	Apariencia	Transparente, translúcida, opaca
	Color	Crema, blanca, roja, amarilla
Morfología celular	Tinción de Gram	Positivo, negativo
	Tipo	Bacilos, cocos, diplococos cocobacilos

Para observar la morfología celular de cada una de las colonias, se utilizó la tinción Gram (en la cual se utiliza el cristal violeta de Hucker, una solución de Lugol como mordiente y solución de safranina como colorante de contraste) en los preparados en seco, que permite distinguir dos tipos de bacterias en relación a la estructura de la pared celular. Las observaciones fueron realizadas en el microscopio óptico Nikon Eclipse E100, utilizando la tinción de Gram.

c) Identificación molecular de las bacterias cultivables

Para la identificación molecular de las bacterias aisladas se utilizaron las herramientas de biología molecular: extracción de ADN, PCR, electroforesis, secuenciación y análisis informático, cuyos protocolos se detallan a

continuación:

- **Extracción de ADN**

Para extraer el ADN bacteriano se utilizó el Buffer Fosfato Alcalino (PBS), que por ebullición permitió la fragmentación de células bacterianas. Para ello, las cepas bacterianas puras crecidas en medio mineral suplementado con glifosato e incubadas a 28°C por 24 horas se colocaron en microtubos eppendorf con agua destilada estéril y centrifugadas a 10 000 rpm por 2 minutos, eliminándose el sobrenadante y conservando solo el pellet (Fig.4). La ruptura de las paredes celulares de las cepas bacterianas se hicieron con Tris HCl (ácido clorhídrico) – EDTA (1x) y se centrifuga nuevamente a 10 000 rpm por 2 minutos, eliminándose el sobrenadante y luego re-suspendiendo el sedimento en 200 µl de TE 1X [(137mM de Cloruro de Sodio (NaCl₂), 2.7 mM de Cloruro de Potasio (KCl), 10 mM de Fosfato de Sodio Di básico (Na₂HPO₄), 8 mM de Fosfato de Potasio Di hidrogenado (KH₂PO₄)], posteriormente, los tubos se sometieron a un shock térmico con ebullición por 10 minutos, seguido por un enfriamiento en hielo por 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm por 2 minutos y se retiró el sobrenadante sin tocar el pellet; este fue re-suspendido en agua ultra pura, se adicionó ARNasa (0.1 mg/ml) para eliminar restos de ARN, luego se incubó a 37°C por 1 hora. Las muestras así procesadas se almacenaron a - 20 °C para la conservación del ADN.

- **Cuantificación de ADN**

Para la cuantificación de ADN fue necesario utilizar la lectura de muestra de ADN extraído de cada una de las cepas bacterianas aisladas del agua residual agrícola, en el Espectrofotómetro de microvolúmenes NanoPhotometer® Implen NP80, esto se realizó para conocer la presencia o ausencia de ADN, el grado de pureza y la concentración de ADN extraído (Fig. 5).



Figura 4. Extracción de ADN de bacterias aisladas de agua residual agrícola

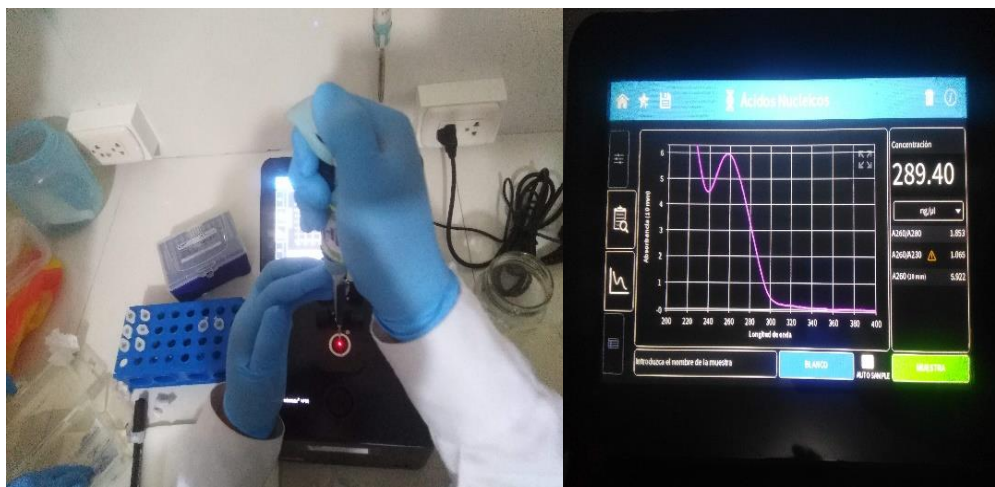


Figura 5. Cuantificación de ADN extraído de bacterias aisladas de agua residual agrícola

- Amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica se utiliza para sintetizar un fragmento de ADN utilizando la enzima Taq ADN polimerasa que trabaja a temperaturas elevadas (extraída de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a temperaturas de 79°C a 85°C).

Al realizar una reacción de PCR simulamos en la célula una sintetización del ADN cuando son mezclados los ingredientes necesarios para hacerlo. Se realizó la PCR utilizando los primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC-3') y 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). El mix de reacción de la PCR incluyó concentraciones finales de: Buffer Taq 1X (Thermo Scientific); Taq DNA polymerase recombinant 0.04 U/μl (Thermo Scientific); 2.5 mM MgCl₂ (Thermo Scientific); 0.2 mM dNTP's; 0.36 pmol de cada primers; 2 μl de ADN y llevados hasta un volumen final de 25 μl con agua ultra pura, los ciclos de amplificación fueron realizados en un termociclador (BLUE-RAY turbocicler) con un programa establecido para fragmentos del gen 16S: un paso inicial de pre-desnaturalización a 94° C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94° C por 30 s, 58° C por 45 s, 72° C por 90 s y un paso de elongación final de 72° C por 6 min.

- Electroforesis

Los productos de PCR fueron migrados en gel de agarosa al 1.5% en el equipo (Cleaver Scientific Ltd. AG500) a 90 Voltios por 30 minutos en 60 ml de buffer TAE 1X (40 mM Tris-Acetato; 1 mM EDTA). El gel se tiñó con 3 μl bromuro de etidio (10 mg/ml) y finalmente los amplicones se visualizaron en un transiluminador (Vilber Lourmot TFX20M) bajo luz ultravioleta (UV) (Fig. 6).

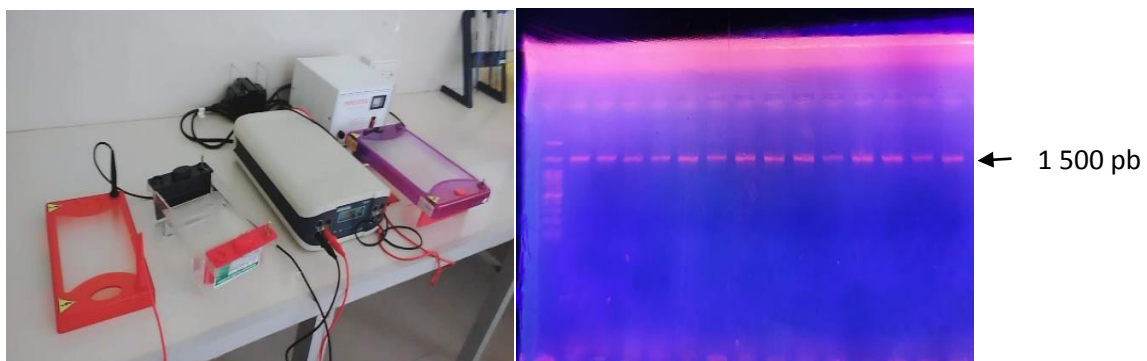


Figura 6. Visualización de los amplicones de fragmentos del ADN de bacterias aisladas de agua residual agrícola.

- **Secuenciación y análisis informático**

Los amplicones fueron enviados al laboratorio de la empresa MACROGEN (USA) para su realizar la secuenciación simple (forward). El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se realizó con la herramienta ClustalW incluida en el software bioinformático MEGA 6.0 (<http://www.megasoftware.net/>) y posteriormente analizadas en el programa online BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology, Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.2.2.3. Evaluación in vitro del crecimiento de bacterias en diversas concentraciones de glifosato.

Las bacterias aisladas del agua residual agrícola que crecieron en medio mínimo mineral (MSM) con glifosato (GP) fueron evaluadas para conocer su posible resistencia a este herbicida. Para ello, fue necesario exponerlas a diversas concentraciones de GP, las concentraciones que se utilizaron fueron: 1, 2 y 3 gl^{-1} (preparadas a partir de una formulación comercial de 480 gl^{-1} de glifosato).

Se inoculó 4 μl (1×10^8 UFC/ml) de cada una de las cepas bacterianas después de las 48 horas de reactivación sobre placas Petri que contenían discos de papel filtro de 5 mm de diámetro y MSM-agar con GP en las diferentes concentraciones. Se encubaron a 28 °C por 48 horas, momento en el cual se evaluó su crecimiento en base al área de la corona circular (Fig. 7) utilizando la fórmula matemática $A = \pi \cdot r^2$, Palmer (como se citó en García León, 2020)

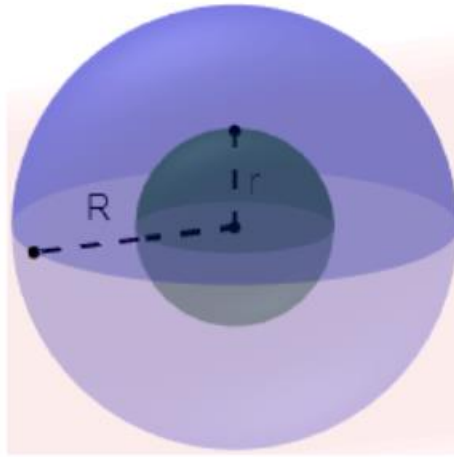


Figura 7. Representación de los círculos concéntricos mostrando el área de la corona circular.

El área de la corona circular se ha determinado por diferencia entre las áreas de los dos círculos concéntricos (el mayor de radio R y el menor de radio r)

$$A_c - a_c = \pi (R^2 - r^2)$$

A_c : Área del círculo mayor

a_c : Área del círculo menor (disco de papel)

R: Radio Mayor

r: Radio menor (la mitad del disco de papel = 2.5 mm)

π : Valor constante (3,1416)

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis físico-químico del agua residual Agrícola

Los valores de los parámetros físico-químicos son un indicador de la calidad del agua y condicionan la vida de los diferentes organismos que se encuentran presentes en ella. En la tabla 3 se muestran los resultados del análisis físico-químico del agua residual agrícola, donde podemos apreciar que, el aspecto del agua varió entre ligeramente turbio y turbio; la temperatura fue constante, y el pH moderadamente alcalino; mientras que la C.E estuvo en alrededor de 3.4-3.5. Los valores de estos tres últimos parámetros se encuentran dentro de los rangos para el crecimiento óptimo de las bacterias benéficas (Casellas et al., 1998; Mehta et al., 1979).

Los niveles de oxígeno disuelto y sólidos disueltos totales, no excedieron los ECA para agua, categoría 3 D-1 (MINAM, 2017) y son considerados normales para el desarrollo de la vida acuática (Hahn-vonHessberg et al., 2009). El DBO₅ muestra valores reducidos en los sectores muestreados, indicando que parte del oxígeno estaría siendo utilizados para degradar la materia orgánica (no medida) presente, lo cual le daría la apariencia de color turbio. Además, la presencia del oxígeno en el agua es importante en la oxidación biológica del amonio a nitritos, su deficiencia ocasionaría que los microorganismos realicen la nitrificación de una manera acelerada, puesto que, los datos de nitrógeno amoniacal y orgánico son importantes para determinar si el sustrato contiene suficiente nitrógeno para nutrir a los organismos (Hahn-vonHessberg et al., 2009). Los resultados muestran valores de este elemento por debajo de la normativa legal ECA para agua, categoría 3 D-2 (MINAM, 2017), con lo cual los microorganismos lo estarían utilizando como fuente de energía al igual que el fósforo.

Tabla 3. Caracterización Físico-química del agua residual agrícola en drenes de tres sectores muestreados.

Tipo de análisis	Parámetros	Sector 1	Sector 2	Sector 3
Físico	Apariencia	Turbia	Ligeramente Turbia	Turbio
	pH	7.74	7.32	7.54
	T (°C)	26.2	26.1	26.2
	C.E (µmhos/cm)	3.42	3.53	3.58
	OD (mg/l)	7.70	8.18	7.60
	S. D.T (mg/l)	294	286	278
Químico	NO ₂ (mg/l)	3.5	0.1	0.08
	PO ₄ (mg/l)	2.55	0.29	0.17
	DBO ₅ (mg/l)	73.36	87.52	86.14

4.2. Caracterización morfológica de bacterias del agua residual agrícola.

En la Tabla 4, se presentan las diferentes características morfológicas de las 14 colonias bacterianas aisladas del agua residual agrícola en tres sectores de los drenes agrícolas, crecidas en el medio MSM suplementado con 0.5 g/l de glifosato. Observamos un crecimiento que va desde moderado (70%) a abundante (30%), su forma varió de circular (50%), rizado (20%) a irregular (30%); mientras que, la mayoría de las colonias tuvieron un tamaño pequeño (65%), y en menor cantidad puntiforme (35%). Asimismo, la mitad de las colonias presentaron borde entero (50%) y la otra mitad ondulados (50%), todas las colonias tuvieron una textura lisa y elevación plana. En cuanto el color y apariencia varió de crema translúcida, crema transparente, blancas translúcidas, blanca transparente y otras fueron simplemente transparentes o translucidas.

En lo que respecta a la morfología celular, observamos que todas las

bacterias tuvieron forma de bacilos y la expresión de color de la pared celular en respuesta a la Tinción Gram fue también negativa, debido a que las bacterias Gram negativas ejercen una notable influencia en la resistencia de contaminantes producto del mecanismo que expresa la membrana externa de las bacterias gram negativas a diferencia de las bacterias Gram positivas que presentan una pared de peptidoglicanos considerado punto débil de la bacteria Gram +. .

Tabla 4. Descripción de la morfología colonial y celular de los aislados bacterianos en medio de cultivo MSM suplementado con 0.5 g/l de GP.

Puntos Muestreados	Código	Morfología celular		Morfología de la Colonia						
		Forma	Gram	Forma	Borde	Elevación	Tamaño	Textura	Color-Apar.	Crecimiento
1	R1	B	-	R	ON	P	PE	LI	CT	++
	R2	B	-	IR	EN	P	PU	LI	CT	++
	R3	B	-	R	ON	P	PE	LI	CT	++
	R4	B	-	IR	EN	P	PE	LI	CT	+
	R5	B	-	IR	ON	P	PU	LI	CT	+
	R7	B	-	R	LO	P	PU	LI	TR	++
	R8	B	-	C	ON	P	PE	LI	T	+
	2	R10	B	-	C	ON	P	PE	LI	CTR
R11		B	-	C	EN	P	PU	LI	TR	+
R12		B	-	C	EN	P	PE	LI	TR	+
3	R13	B	-	C	ON	P	PE	LI	BT	+
	R14	B	-	C	ON	P	PE	LI	BTR	+
	R15	B	-	IR	EN	P	PU	LI	CT	+
	R16	B	-	C	EN	P	PE	LI	CT	+

Parámetro	Descripción
Forma celular	(B) Bacilos
Gram	(-) Negativo
Forma de colonia	(IR) Irregular, (CI) Circular (R) Rizado
Borde	(ON) Ondulado, (EN) Entero, (LO) Lobulado
Elevación	(PL) Plana
Tamaño	(PU) Puntiforme, (PE) Pequeño

Textura	(LI) Lisa
Color-Apariencia	(T) Transparente, (CT) Crema Transparente, (TR) Translúcida, (CTR) Crema Translúcida, (BT) Blanca transparente, (BTR) Blanca translúcida.
Crecimiento	(+) Moderado, (++) Abundante

En la figura 8, se observa algunas colonias bacterianas y la característica tintorial Gran negativa de los bacilos frente a la tinción empleada.

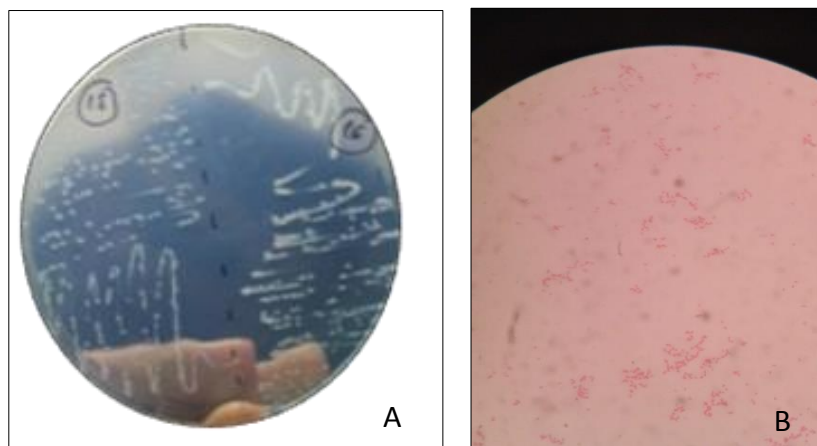


Figura 8. (A) Morfología y (B) tinción Gram negativa de bacterias aisladas en medio de cultivo MSM suplementado con glifosato.

4.3. Evaluación in vitro del crecimiento de bacterias en diversas concentraciones de glifosato.

Los resultados indican que la mitad de las cepas bacterias aisladas del agua residual agrícola proceden del sector 1 (siete cepas), seguido del sector 3 (4 cepas) y sector 2 (3 cepas) (Tabla 5). Todas las bacterias crecieron en el medio de cultivo MSM suplementado con 1 gl^{-1} de glifosato, destacando por su mayor diámetro y área circular aquellas codificadas como R7, R11, R12, R13, R15 y R16; mientras que con concentración de 2 gl^{-1} glifosato sobresalieron las cepas R13 y R7. Asimismo, en la concentración de 3 gl^{-1} de glifosato tuvieron el mayor crecimiento las bacterias R13 y R8; en tanto que, las cepas R1, R2, R3, R4, R7, R12, y R16 no lograron sobrevivir. En la figura 9 podemos apreciar el crecimiento

de la bacteria R5 en las diferentes concentraciones de glifosato ensayadas.

Tabla 5. Crecimiento de los aislados bacterianos en medio MSM suplementado con diferentes concentraciones de GP.

Muestra del sector	Código	Diámetro de la colonia (mm)			Área circular de la colonia (mm ²)		
		1 gl ⁻¹	2 gl ⁻¹	3 gl ⁻¹	1 gl ⁻¹	2 gl ⁻¹	3 gl ⁻¹
1	R1	10.8	10.5	-	71.94	66.92	-
	R2	9	8	-	43.96	30.62	-
	R3	10	-	-	58.88	-	-
	R4	8	-	-	30.62	-	-
	R5	10	10.5	11	58.88	66.92	75.36
	R7	11	11.5	-	75.36	84.19	-
	R8	10.7	11	11.5	70.25	75.36	84.19
2	R10	10	10.5	11	58.88	66.92	75.36
	R11	11	10.5	10.5	75.36	66.92	66.92
	R12	11	-	-	75.36	-	-
3	R13	11	12	12	75.36	93.42	93.42
	R14	10	10	9.5	58.88	58.88	51.22
	R15	11	10.5	10.5	75.36	66.92	66.92
	R16	11	-	-	75.36	-	-

(-) sin crecimiento

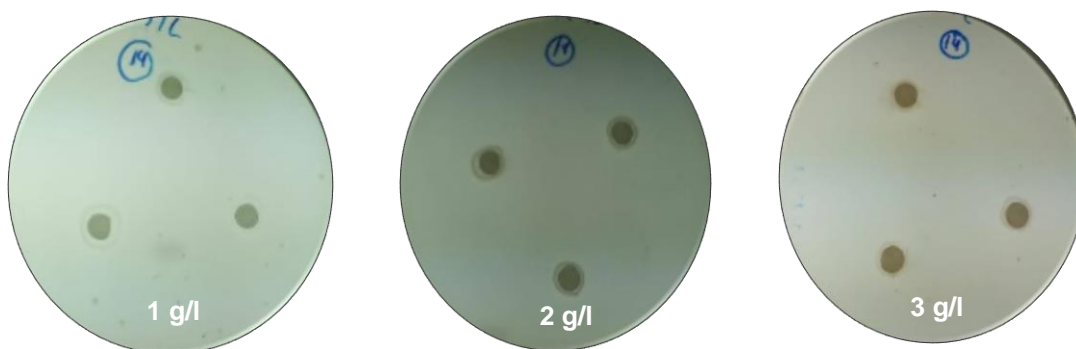


Figura 9. Crecimiento in vitro de la cepa bacteriana R14 en medio MSM suplementado con tres concentraciones de glifosato.

4.4. Identificación molecular de las bacterias aisladas

Las bacterias crecidas en el medio de cultivo MSM suplementado con diversas concentraciones de glifosato y aisladas del agua residual agrícola fueron identificadas basándose en la secuencia parcial del gen ribosomal 16S ADN, mediante análisis del programa online BLAST y comparándolos con la base de datos del NCBI, teniendo en cuenta el tamaño del amplicón (número de pares de bases), el porcentaje de homología y el microorganismo con mayor grado de identidad de la secuencia. Se identificaron 14 especies de bacterias pertenecientes al filo Proteobacterias, de las cuales 2 son del género *Klebsiella* y 12 del género *Pseudomonas*, de estas últimas, 6 se identificaron como *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 6).

Tabla 6. Identificación molecular de bacterias de agua residual agrícola, aisladas en medio MSM con glifosato, mediante secuenciación del ARNr 16S.

Código	Identidad en GenBank	e-Valor	Identidad (%)	Accesión
R1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0	99.69	KP866815.2
R2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.0	99.06	KX572971.1
R3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0	100.00	AB900067.1
R4	<i>Klebsiella sp.</i>	0.0	99.37	MT261888.1
R5	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	0.0	98.89	KF527824.1
R7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0	99.38	MK875171.1
R8	<i>Pseudomonas sp.</i>	0.0	99.48	MK533950.1
R10	<i>Pseudomonas putida</i>	0.0	99.59	KP762566.1
R11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0	99.18	KC893551.1
R12	<i>Pseudomonas sp.</i>	0.0	90.94	MH588285.1
R13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0	99.08	KC893551.1
R14	<i>Pseudomonas sp.</i>	0.0	99.26	MF111944.1
R15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0	99.58	AB900067.1
R16	<i>Pseudomonas sp.</i>	0.0	99.60	CP045554.1

Algunos estudios realizados también reportan a estas especies bacterianas como las más abundantes en los diversos tipos de aguas residuales y suelos agrícolas; puesto que son organismos que subsisten en sitios con alto contenido de contaminantes (Hernández-Gómez et al.,

2014; Kuan et al., 2016; Mitra et al., 2018). Aunque, son escasos los estudios de microorganismos de aguas residuales agrícolas, sin embargo, algunas de estas bacterias identificadas han sido encontradas en otros ecosistemas, calificándolas como patógenas para la salud humana, mientras que otras son consideradas benéficas para el ambiente, debido al potencial de degradación de contaminantes (de Alencar et al., 2017; Yelena et al., 2013).

El glifosato es uno de los herbicidas más potentes para erradicar malezas en la agricultura (Solange, 2011); sin embargo, su presencia ocasiona daños directos e indirectos a los diversos ecosistemas (Varona et al. (2009), incluyendo a las comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera (Newman et al. 2016). Un estudio realizado por estos últimos autores concluye que, en presencia o ausencia de glifosato, el microbiota del suelo está dominada por miembros de los filos Proteobacteria, Acidobacteria y Actinobacteria. En nuestro trabajo encontramos que, todas las bacterias identificadas pertenecen al filo proteobacterias, y su baja población de especies en el agua residual agrícola, se debería en gran medida a la presencia de este herbicida y otros contaminantes químicos.

De las bacterias identificadas, 12 pertenecen al género *Pseudomonas*, las cuales se caracterizan por su ubicuidad, ya que pueden vivir prácticamente en todos los hábitats naturales y tienden a destacar entre las demás bacterias que se encuentran en la rizósfera de las plantas (Mayz & Manzi, 2017). Algunos estudios realizados también reportan el crecimiento de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. plecoglossicida*, *Pseudomonas sp* y *P. putida*) en medios de cultivo enriquecido con glifosato como fuente de carbono (Ezaka et al., 2019; Hoodaji et al., 2012; Cheloufi et al., 2017; Olawale & Akintobi, 2011; Zhao et al., 2015, Bracho et al., 2004). Aunque, una investigación realizada por Peñaloza-Vazquez et al. (1997), lograron obtener treinta y cuatro cepas de *Pseudomonas* crecidas en medio de cultivo con glifosato como única fuente de fósforo.

Si bien en este trabajo, no se realizaron pruebas bioquímicas que demuestren la degradación del glifosato por las bacterias identificadas, ciertos reportes bibliográficos mencionan esta función biológica en algunas de ellas. Li et al. (2015) encontraron que la especie *Pseudomonas plecoglossicida*, tiene la capacidad de degradar la ciclohexilamina (amina utilizada para la producción industrial de insecticidas) como única fuente de carbono y nitrógeno. Esta bacteria expresó un crecimiento abundante en las diversas concentraciones de GP ensayadas en nuestro estudio.

Lima et al. (2014) ensayaron la Influencia del glifosato en plancton y el crecimiento poblacional de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®15442 en diferentes concentraciones de este herbicida, concluyendo que éstas reducen la densidad de cultivos aeróbicos planctónicos, pero favorece el crecimiento anaeróbico planctónico, además, de interferir en la capacidad de crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC®15442.

El aislado bacteriano de *Pseudomonas putida* demostró una alta tolerancia al GP creciendo en la concentración máxima ensayada de 3 g l⁻¹, dato que se asemeja al obtenido por Ouided & Abderrahmane (2013) quienes demostraron que la bacteria *P. putida* es capaz de tolerar este herbicida hasta una concentración de 9 g l⁻¹.

Otra bacteria identificada en nuestro análisis molecular ha sido *Pseudomonas plecoglossicida*, la cual puede ser aislada de suelos o productos agrícolas (Kuan et al., 2016; Mayz & Manzi, 2017; Yan et al., 2017). Asimismo, esta bacteria ha sido ensayada en diversos estudios de biodegradación del insecticida organofosforado profenos en agua contaminada con presencia o ausencia de oxígeno (Subsanguan et al., 2020) con resultados promisorios.

En lo que respecta al género *Klebsiella*, algunas investigaciones revelan su capacidad para degradar herbicidas (Munees, 2011; Silver et al., 2019) y otros compuestos químicos (Manogaran et al., 2017). En el caso del GP,

un experimento realizado por Munees (2011) determinó que la cepa *Klebsiella sp.* aislada de la rizósfera de mostaza toleró una concentración de 2 800 µg/ml de GP. La forma de la especie *Klebsiella oxytoca* cepa Saw-5 ha sido descrita como una bacteria que reduce el molibdeno a una forma menos tóxica; así como su capacidad de crecer en medios enriquecidos con GP (Kuan et al., 2016). La presencia de esta bacteria en el agua residual agrícola nos permite suponer que en condiciones desfavorables de nutrición podría utilizar algunos contaminantes químicos como fuente de energía para su crecimiento.

Los resultados de este trabajo son de gran importancia, puesto que constituye los primeros datos de bacterias aisladas e identificadas en agua residual agrícola en el país, y que podrían tenerse en cuenta para actividades de remediación de ecosistemas acuáticos con presencia de contaminantes químicos.

V. CONCLUSIONES

A partir del agua residual agrícola se aislaron selectivamente en medio mínimo mineral con glifosato 14 cepas bacterianas, las cuales utilizarían al GP como fuente de energía. Sin embargo, solo 9 cepas bacterianas expresaron un mayor potencial de tolerancia al GP, debido a que pudieron crecer en concentraciones de 1, 2 y 3 g l^{-1} de este herbicida. Su identificación mediante el análisis de secuencia parcial del gen ARNr 16S, nos permitió determinar la presencia de especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Klebsiella*.

VI. RECOMENDACIONES

Realizar una caracterización metagenómica del agua residual agrícola para determinar las poblaciones de microorganismos presentes en ellas.

Analizar cualitativa y cuantitativamente la presencia del GP en las aguas residuales agrícolas.

Realizar experimentos de degradación del GP con las bacterias identificadas.

Efectuar un análisis proteómico y metabolómico de las bacterias para conocer las proteínas y otros metabolitos que influyen en la resistencia bacteriana frente al glifosato.

Evaluar ensayos de biorremediación de aguas a nivel de laboratorio y campo.

Realizar identificación filogenética para conocer las relaciones existentes entre las cepas aisladas del agua residual agrícola.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- Allegrini, M., Gomez, E. del V., & Zabaloy, M. C. (2017). Repeated glyphosate exposure induces shifts in nitrifying communities and metabolism of phenylpropanoids. *Soil Biology and Biochemistry*, *105*, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.11.024>
- Alvarado-cap, Y., & Guti, T. (2010). *Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias endófitas en el cultivo del sorgo (Sorghum bicolor (L .) Moench)*. February 2016.
- Argüello-rangel, J., Triana-garcía, P. A., & Eslava-mocha, P. R. (2015). Células Granulares Eosinofílicas / Células Mast (CGE / MC) y su relación con los efectos de herbicidas : Caso del Glifosato y surfactantes acompañantes en peces Eosinophilic granular cells / Mast cells and their relation with the effects of herbicides : *Orinoquia*, *9*(1), 59–76. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5441170.pdf>
- Bento, C. P. M., Yang, X., Gort, G., Xue, S., van Dam, R., Zomer, P., Mol, H. G. J., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2016). Persistence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in loess soil under different combinations of temperature, soil moisture and light/darkness. *Science of the Total Environment*, *572*, 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.215>
- Bracho, M., Díaz, L., & Soto, M. (2004). Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas* spp. *Ciencia*, *12*(4), 269–275.
- Brunharo, C. A. D. C. G., Morran, S., Martin, K., Moretti, M. L., & Hanson, B. D. (2019). EPSPS duplication and mutation involved in glyphosate resistance in the allotetraploid weed species *Poa annua* L. In *Pest Management Science* (Vol. 75, Issue 6). <https://doi.org/10.1002/ps.5284>
- Buenos, U. De, & Luciano, A. (2018). *Estrategias de rizorremediación de glifosato en suelos bajo explotación agrícola intensiva*.
- Calderon, I., Vera, F., & Hernandez, L. jorge. (2019). Efectos de la salud en poblaciones expuestas a Glifosato: Una revision. *Hilos Tensados*, *1*, 1–476.
- Casellas, M., Grifoll, M., Sabaté, J., & Solanas, A. M. (1998). Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. *Canadian Journal of Microbiology*, *44*(8), 734–742. <https://doi.org/10.1139/w98-066>
- Castro, F. E. (2017). Informe de Tesis. In *La Molina*.
- Celaya-Michel, H., & Castellanos-Villegas, A. E. (2011). Nitrogen mineralization on arid and semi-arid land soil. *Terra Latinoamericana*, *29*, 343–356. <http://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v29n3/2395-8030-tl-29-03-00343.pdf><http://www.cabdirect.org/abstracts/20123049100.html>
- Chang, E. T., & Delzell, E. (2016). Systematic review and meta-analysis of

- glyphosate exposure and risk of lymphohematopoietic cancers. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 51(6), 402–434.
<https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1142748>
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloy, M. G. J., Orange, N., Dufour, A., & Cornelis, P. (n.d.). *Structure, function and regulation of Pseudomonas aeruginosa porins*. April 2017.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>
- Cinthya Vanessa Imbago Pulamarín; Evelyn Andrea Oña Lugmaña. (2019). *Biorremediación De Agua Contaminada Con Arsénico Proveniente De La Parroquia Toacaso, Mediante El Uso De Pleurotus Ostreatus, Trichoderma Harzianum Y Pseudomonas Aeruginosa*. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito.
- de Alencar, F. L. S., Navoni, J. A., & do Amaral, V. S. (2017). The use of bacterial bioremediation of metals in aquatic environments in the twenty-first century: a systematic review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(20), 16545–16559. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9129-8>
- Defarge, N., Takács, E., Lozano, V. L., Mesnage, R., de Vendômois, J. S., Séralini, G. E., & Székács, A. (2016). Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(3).
<https://doi.org/10.3390/ijerph13030264>
- Dewer, Y. (2018). *Neonicotinoids and their Impact on Ecosystem Services for Agriculture and Biodiversity in Africa* (Issue November).
<http://research.assaf.org.za/handle/20.500.11911/109%0Ahttp://hdl.handle.net/20.500.11911/109>
- Ebenau-Jehle, C., Mergelsberg, M., Fischer, S., Bröls, T., Jehmlich, N., Von Bergen, M., & Boll, M. (2017). An unusual strategy for the anoxic biodegradation of phthalate. *ISME Journal*, 11(1), 224–236.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2016.91>
- Eschenburg, S., Healy, Æ. M. L., Priestman, M. A., & Lushington, Æ. G. H. (2002). *How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from Escherichia coli*. 129–135. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0908-0>
- Ezaka, E., Akintokun, A. K., Akintokun, P. O., Taiwo, L. B., Uthman, A. C. O., Oyedele, O. A., & Aluko, O. I. (2019). Glyphosate Degradation by Two Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) Isolated from Rhizosphere of Maize. *Microbiology Research Journal International*, 26(6), 1–11.
<https://doi.org/10.9734/mrji/2018/v26i630081>
- FAO. (2013). Código Internacional De Conducta Para La Distribución Y Utilización De Plaguicidas. Lista Registrada de Directrices para la implementación del Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. (*Organización de Las Naciones Unidas Para La Agricultura y El Desarrollo*), 15. <http://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf>

- Fu, Gui-ming, Li, R., Li, K., Hu, M., Yuan, X., & Li, B. (2016). *Optimization of liquid-state fermentation conditions for the glyphosate-degradation enzyme production of strain Aspergillus oryzae by ultraviolet mutagenesis*. 6068(March). <https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1135462>
- Fu, Gui ming, Chen, Y., Li, R. yi, Yuan, X. qiang, Liu, C. mei, Li, B., & Wan, Y. (2017). Pathway and rate-limiting step of glyphosate degradation by *Aspergillus oryzae* A-F02. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(8), 782–788. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1342260>
- Fu, Guiming, Li, R., Wu, X., Gao, B., Yuan, X., Wan, C., & Liu, C. (2016). *Glyphosate Bioremediation of Contaminated Fish-pond Water by Paenibacillus sp. FUJX 401 from Industrial Activated Sludge*. *Bbe*, 428–436. <https://doi.org/10.2991/bbe-16.2016.66>
- García León, M. F. (2020). *Identificación molecular de bacterias con potencial fijador de nitrógeno, asociadas a la rizósfera de Prosopis pallida “algarrobo.”* Universidad Nacional de Tumbes.
- Geiger, R. A., Junghare, M., Mergelsberg, M., Ebenau-Jehle, C., Jesenofsky, V. J., Jehmlich, N., von Bergen, M., Schink, B., & Boll, M. (2019). Enzymes involved in phthalate degradation in sulphate-reducing bacteria. *Environmental Microbiology*, 21(10), 3601–3612. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14681>
- Grandcoin, A., Piel, S., & Baurès, E. (2017). AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate. *Water Research*, 117, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.055>
- Guijarro, K. H., Aparicio, V., De Gerónimo, E., Castellote, M., Figuerola, E. L., Costa, J. L., & Erijman, L. (2018). Soil microbial communities and glyphosate decay in soils with different herbicide application history. *Science of the Total Environment*, 634, 974–982. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.393>
- Hahn-vonHessberg, C., Toro, D., Grajales-Quintero, A., Duque-Quintero, G., & Serna-Uribe, L. (2009). Determinación De La Calidad Del Agua Mediante Indicadores Biológicos Y Físicoquímicos, En La Estación Piscícola, Universidad De Caldas, Municipio De Palestina, Colombia. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 13(2), 89–105.
- Hernández-Gómez, C., Blanco, V. M., Motoa, G., Correa, A., Maya, J. J., de la Cadena, E., Perengüez, M., Rojas, L., Hernández, A., Vallejo, M., Villegas, M. V., Martínez, E., Pallares, C., Rosso, F., Vélez, J. D., Castañeda, C., Muñoz, M., Vanegas, B., Matta, L., ... Torres, A. M. (2014). Evolution of antimicrobial resistance in Gram negative bacilli from intensive care units in Colombia. *Biomedica*, 34(SUPPL.1), 91–100. <https://doi.org/10.1590/S0120-41572014000500011>
- Hoodaji, M., Tahmourespour, A., & Partoazar, M. (2012). The efficiency of glyphosate biodegradation by *Pseudomonas (Aeruginosa)*. *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges, Malaga, Spain, 14 - 16 September 2011*, 7, 183–186.

https://doi.org/10.1142/9789814405041_0036

- Huang, L., Liu, W., Jiang, Q., Zuo, Y., Su, Y., & Zhao, L. (2018). *Integration of Transcriptomic and Proteomic Approaches Reveals the Temperature-Dependent Virulence of Pseudomonas plecoglossicida*. 8(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00207>
- INEI. (2018). Compendio estadístico del Perú 2018. *Instituto Nacional de Estadística e Informática*, 88. https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1375/cap01/cap01.pdf
- Kim, Y. H., Lee, J. H., Cho, K. W., Lee, D. W., Kang, M. J., Lee, K. Y., Lee, Y. H., Hwang, S. Y., & Lee, N. K. (2016). Prognostic Factors in Emergency Department Patients with Glyphosate Surfactant Intoxication: Point-of-Care Lactate Testing. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 119(6), 604–610. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12624>
- Kuan, K. B., Othman, R., Rahim, K. A., & Shamsuddin, Z. H. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS ONE*, 11(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152478>
- la Cencilia, D., & Maggi, F. (2018). Analysis of glyphosate degradation in a soil microcosm. *Environmental Pollution*, 233, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.017>
- Li, X., Li, C., Mao, L., Yan, D., & Zhou, N. (2015). Complete genome sequence of the cyclohexylamine-degrading *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12. *Journal of Biotechnology*, 199, 29–30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.011>
- Lima, I. S., Baumeier, N. C., Rosa, R. T., Maria, P., Campelo, S., Antonio, E., & Rosa, R. (2014). *Influence of glyphosate in planktonic and biofilm growth of Pseudomonas aeruginosa*. 975, 971–975.
- Losada, C. (2004). *Desenvolupament de metodes de preconcentració emprant membranes líquides supotades i extracció en fase sòlid per a la detreminació de l'herbicida glifosat i el seu metabòlit ampa en aigües natural*. www.tdr.cesca.es/TESIS_Udg/AVAILABLE/TDX-0817104134215//tcr1.pdf.
- Manogaran, M., Aqlima, S., Nur, A., Yasid, A., & Muhammad, H. (2018). Characterisation of the simultaneous molybdenum reduction and glyphosate degradation by *Burkholderia vietnamiensis* AQ5 - 12 and *Burkholderia* sp . AQ5 - 13. *3 Biotech*, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1141-2>
- Manogaran, M., Shukor, M. Y., Yasid, N. A., Johari, W. L. W., & Ahmad, S. A. (2017). Isolation and characterisation of glyphosate-degrading bacteria isolated from local soils in Malaysia. *Rendiconti Lincei*, 28(3), 471–479. <https://doi.org/10.1007/s12210-017-0620-4>
- Manogaran, M., Shukor, M. Y., Yasid, N. A., Khalil, K. A., & Ahmad, S. A.

- (2018). Optimisation of culture composition for glyphosate degradation by *Burkholderia vietnamiensis* strain AQ5-12. 3 *Biotech*, 8(2).
<https://doi.org/10.1007/s13205-018-1123-4>
- Mayz, J. C., & Manzi, L. V. (2017). Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en la rizosfera de *Samanea saman* (Jacq.) Merr. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 29–37.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57408>
- Mehta, A. P., Torma, A. E., & Murr, L. E. (1979). Effect of environmental parameters on the efficiency of biodegradation of basalt rock by fungi. *Biotechnology and Bioengineering*, 21(5), 875–885.
<https://doi.org/10.1002/bit.260210510>
- Melo, J., Carolino, M., Carvalho, L., Correia, P., Tenreiro, R., Chaves, S., Meleiro, A. I., Souza, S. B. De, Dias, T., Cruz, C., & Ramos, A. C. (2016). Crop management as a driving force of plant growth promoting rhizobacteria physiology. *SpringerPlus*. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3232-z>
- Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., & Séralini, G. E. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 133–153.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. (2015). Arroz. In MINAG-OGPA/OEP (Ed.), *PBI*. <https://www.midagri.gob.pe/portal/26-sector-agrario/arroz>
- Ministerio del Ambiente. (2017). Estándares de Calidad Ambiental para Agua (ECA). *El Peruano*, 6–9. <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/06/DS-004-2017-MINAM.pdf>
- Mitra, S., Pramanik, K., Ghosh, P. K., Soren, T., Sarkar, A., Dey, R. S., Pandey, S., & Maiti, T. K. (2018). Characterization of Cd-resistant *Klebsiella michiganensis* MCC3089 and its potential for rice seedling growth promotion under Cd stress. *Microbiological Research*, 210, 12–25.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.03.003>
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–65.
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
- Munees, A. S. K. (2011). *Toxicological Effects of Selective Herbicides on Plant Growth Promoting Activities of Phosphate Solubilizing Klebsiella sp.* 532–538. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9740-0>
- Newman, M. M., Hoilett, N., Lorenz, N., Dick, R. P., Liles, M. R., Ramsier, C., & Kloepper, J. W. (2016). Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. *Science of the Total Environment*, 543(2016), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.008>
- Nguyen, D. B., Rose, M. T., Rose, T. J., & van Zwieten, L. (2018). Effect of glyphosate and a commercial formulation on soil functionality assessed by substrate induced respiration and enzyme activity. *European Journal of Soil Biology*, 85(December 2017), 64–72.

- <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2018.01.004>
- Nwinyi, O. C., Ajayi, O. O., & Amund, O. O. (2016). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by two strains of *Pseudomonas*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.026>
- OMS, & FAO. (2014). *Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas*. <https://doi.org/13604S/1/12.14>
- Ouided, B., & Abderrahmane, B. (2013). Isolation and characterization of glyphosate-degrading bacteria from different soils of Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 7(49), 5587–5595. <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6080>
- Paravani, E. V., Sasal, M. C., Sione, S. M. J., Gabioud, E. A., Oszust, J. D., Wilson, M. G., Demonte, L. D., & Repetti, M. R. (2016). Determinación de la concentración de glifosato en agua mediante la técnica de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA). In *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* (Vol. 32, Issue 4, pp. 399–406). <https://doi.org/10.20937/RICA.2016.32.04.03>
- Peñalozza-Vazquez, A., Gilda, M. L., Oropeza, A., & Bailey, A. M. (1997). *The Genes Involved in Glyphosate Utilization by Pseudomonas pseudomallei and the Tolerance Conferred to Plants*. 417–423. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5472-7_76
- Posso Astudillo, S. C. (2019). *Explorando la biodiversidad de consorcios microbianos Amazónicos con capacidad biorremediadora de aguas residuales mediante secuenciación de última generación*.
- Puente, R., Omar, E., Jesús, O. G., Hoyos, B., Manuel, J., Jesús, L. E., Bernardo, M. A., Montiel, H., Guillermo, L., Martínez, A., Gabriela, A., Domínguez, V., & Dolores, R. (2015). Los fertilizantes biológicos en la agricultura. *Invernus*, 10(1), 10–17. <http://www.invernus.uson.mx/revistas/articulos/18-Rueda Puente y Col20151.pdf>
- Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Megharaj, M. (2019). Local applications but global implications: Can pesticides drive microorganisms to develop antimicrobial resistance? *Science of the Total Environment*, 654, 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.041>
- Rodicio, M. D. R., & Mendoza, M. D. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245. <https://doi.org/10.1157/13059055>
- Rodicio, R. (2016). *ionamenc*. 22(4), 238–245.
- Roth, W. K. (2019). History and Future of Nucleic Acid Amplification Technology Blood Donor Testing. *Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie*, 46(2), 67–75. <https://doi.org/10.1159/000496749>
- Sasal, M. C., Wilson, M. G., Sione, S. M., Beghetto, S. M., Gabioud, E. A.,

- Oszust, J. D., Paravani, E. V., Demonte, L., Repetti, M. R., Bedendo, D. J., Medero, S. L., Goette, J. J., Pautasso, N., & Schulz, G. A. (2017). Monitoreo de glifosato en agua superficial en Entre Ríos. La investigación acción participativa como metodología de abordaje. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 43(2), 195–205.
- Selvi, A. A., Sreenivasa, M. A., & Manonmani, H. K. (2011). Enzyme-linked immunoassay for the detection of glyphosate in food samples using avian antibodies. *Food and Agricultural Immunology*, 22(3), 217–228. <https://doi.org/10.1080/09540105.2011.553799>
- Silver, R. J., Paczosa, M. K., McCabe, A. L., Balada-Illasat, J., & Baleja, J. D. (2019). *crossm Amino Acid Biosynthetic Pathways Are Required for Klebsiella pneumoniae Growth in Immunocompromised Lungs and Are Druggable Targets during Infection*. 63(8), 1–14.
- Solange, M. (2011). Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce. *Acta Toxicológica Argentina*, 19(2), 87–88.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (1999). n. *Water Environment Federation*.
- Steinrucken, H. C., & Amrhein, N. (1984). *5-EnoZpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of*. 357, 351–357.
- Subsanguan, T., Vangnai, A. S., & Siripattanakul-ratpukdi, S. (2020). Ecotoxicology and Environmental Safety Aerobic and anoxic degradation and detoxification of profenofos insecticide by *Pseudomonas plecoglossicida* strain PF1. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190(December 2019), 110129. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110129>
- Sun, W., Wang, Q., Luan, F., & Man, Z. (2018). *The Role of kguT Gene in 2-Ketogluconate-Producing Pseudomonas plecoglossicida JUIM01*.
- Sun, Y., Zhuang, Z., Wang, X., Huang, H., Fu, Q., & Yan, Q. (2019). *Fish and Shellfish Immunology Dual RNA-seq reveals the effect of the flgM gene of Pseudomonas plecoglossicida on the immune response of Epinephelus coioides*. 87(October 2018), 515–523. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.041>
- Sviridov, A. V, Shushkova, T. V, Ermakova, I. T., Ivanova, E. V, Epiktetov, D. O., & Leontievsky, A. A. (2015). *Microbial Degradation of Glyphosate Herbicides (Review)*. 51(2), 188–195. <https://doi.org/10.1134/S0003683815020209>
- Tan, H., Hu, Y., He, J., Wu, L., & Liao, F. (2014). *Zearalenone degradation by two Pseudomonas strains from soil*. <https://doi.org/10.1007/s12550-014-0199-x>
- Tazdait, D., Salah, R., Grib, H., Abdi, N., & Mameri, N. (2018). Kinetic study on biodegradation of glyphosate with unacclimated activated sludge. *International Journal of Environmental Health Research*, 28(4), 448–459. <https://doi.org/10.1080/09603123.2018.1487043>

- Tumbes, L. A. R. (2015). *Dirección Regional de Agricultura Gobierno Regional Tumbes Dirección Regional de Agricultura PLAN ESTRATEGICO DEL SECTOR AGRARIO DE LA REGION-TUMBES 2008-2015*.
- Varona, M., Henao, G. L., Díaz, S., Lancheros, A., Murcia, Á., Rodríguez, N., & Álvarez, V. H. (2009). *Evaluación de los efectos del glifosato y otros plaguicidas en la salud humana en zonas objeto del programa de erradicación de cultivos ilícitos*.
- Vera, M. S., Di Fiori, E., Lagomarsino, L., Sinistro, R., Escaray, R., Iummato, M. M., Juárez, A., De Molina, M. D. C. R., Tell, G., & Pizarro, H. (2012). Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology*, 21(7), 1805–1816. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0915-2>
- Wang, P. H., Khusnutdinova, A. N., Luo, F., Xiao, J., Nemr, K., Flick, R., Brown, G., Mahadevan, R., Edwards, E. A., & Yakunin, A. F. (2018). Biosynthesis and Activity of Prenylated FMN Cofactors. *Cell Chemical Biology*, 25(5), 560-570.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.02.007>
- Wang, R., Luo, Y., Chen, H., Yuan, Y., Bingner, R. L., Denton, D., Locke, M., & Zhang, M. (2019). Environmental fate and impact assessment of thiobencarb application in California rice fields using RICEWQ. *Science of the Total Environment*, 664, 669–682. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.003>
- Wang, T., Ren, J., Qu, G., Liang, D., & Hu, S. (2016). Glyphosate contaminated soil remediation by atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma and its residual toxicity evaluation. *Journal of Hazardous Materials*, 320, 539–546. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.067>
- Yan, D., Li, X., Li, C., Mao, L., Chi, X., Zhou, N., & Liu, D. (2017). Genome-wide identification and characterization of genes encoding cyclohexylamine degradation in a novel cyclohexylamine-degrading bacterial strain of *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12. *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.036>
- Yelena V. Kryuchkovaa, Gennady L. Burygina, Natalia E. Gogoleva b, Yuri V. Gogolev b, & Marina P. Chernyshovaa, Oleg E. Makarova, Evgenii E. Fedorova, O. V. T. (2013). Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. *Microbiological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.03.002>
- Yu, X. M., Yu, T., Yin, G. H., Dong, Q. L., An, M., Wang, H. R., & Ai, C. X. (2015). Glyphosate biodegradation and potential soil bioremediation by *Bacillus subtilis* strain Bs-15. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 14717–14730. <https://doi.org/10.4238/2015.November.18.37>
- Zhan, H., Feng, Y., Fan, X., & Chen, S. (2018). *Recent advances in glyphosate biodegradation Glyphosate*.
- Zhang, L., Hang, P., Hu, Q., Chen, X., Zhou, X., Chen, K., & Jiang, J. (2018). *Agricultural and Environmental Chemistry Degradation of Phenylurea Herbicides by a Novel Bacterial Consortium Containing Synergistically*

Catabolic Species and Functionally Complementary Hydrolases.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03703>

Zhao, H., Tao, K., Zhu, J., Liu, S., Gao, H., & Zhou, X. (2015). *Bioremediation potential of glyphosate-degrading Pseudomonas spp . strains.* 170, 165–170. <https://doi.org/10.2323/jgam.61.165>

VII. ANEXOS

Anexo 1. Composición química de medios de cultivos selectivos

- **Medio mínimo mineral (MSM) para aislamiento de bacterias, usando al glifosato (GP) como fuente de carbono.**

Reactivo	(g/l)
NH ₄ SO ₄ (Sulfato de amonio)	2.000
K ₂ HPO ₄ (Fosfato dipotásico)	0.625
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (Fosfato de sodio monobásico dihidrato)	0.600
MgSO ₄ ·7H ₂ O (sulfato de magnesio heptahidratado)	0.200
CaCl ₂ ·6H ₂ O (Cloruro de calcio hexahidratado)	0.150

pH 7.0

- **Composición del medio de Extracción de ADN y PCR (Método de ebullición en Buffer Fosfato Alcalino)**

Reactivo	Concentración
TAE	1%
NaCl ₂	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1.8 mM

pH de 7.4

- **Composición del Mix de reacción de PCR**

Reactivo	Concentración
Agua Ultra Pura	25 µl
Buffer	1X (2.5 µl)
DNTPs	0.2 mM (0.5 µl)
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	2 mM (2 µl)
Forward Primer	0.36 µM (0.6 µl)
Reverse Primer	0.36 µM (0.6 µl)
Taq. Polimerasa	0.5 U/µl (0.1 µl)
ADN molde	2 µl

Anexo 2. Secuencias de las bacterias identificadas

R1- *Pseudomonas aeruginosa*

GAGGGTCGCTTAATCGGGACTTACTGGGCGTAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGA
TGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAACTACTGAGCTAGAGTACGGT
AGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAG
TGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCC
TTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATT
GGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGA
TGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTG
GGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCA
TCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCA
AGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT
CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTT
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAG
TCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTGACTGGGGTGAAGTCGTAACA
GGGTTAACCGTAAAATTT
TCTTTTTTTTTTTTTGTT
TTGTTTTGCTTTTTCTGTCCCGATTTTTTCGGTTTTTATTTCTTCTGCTTTTTGCTTTTGCG
GCCCCATGTGGCTCTCCGTACCGTTCGCGCTTTAGTGGTTTTTTTTTCTTTGGCCTTTTGC
TGCGCTTTGTATTTTTTTTTGTATTGCTCCTATATCGTACAAATGCGCCACCATGA

R2- *Klebsiella oxytoca*

TATAGAATGGATTATCGGACTTACTGGGCGTAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGA
TGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGT
AGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCG
GTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCC
TTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT
TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGAT
TGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAA
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCC

R4- *Klebsiella sp.*

GCGGGCACGGTTATCGGATTACTGGGCGTAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGA
TGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGCGAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGT
AGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCG
GTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTGCC
TTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT
TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGAT
TGGTGCCTTCCGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTGTGAA
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCC
GGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCA
TCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGA
CCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACT
CGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTT
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAG
CTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCTAAGAGG
GGAAACCCCAAAAAAAAAAAGGGTATCGGTTGCGGGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GG
GG
GG
GG
GG

R5- *Pseudomonas plecoglossicida*

TAGGTCCGTATCGGATTACTGGGCGTAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTG
AAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAG
GGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAG
ATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA
AAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAG
CAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTG
CCTTCGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGC
ACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCC
GCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGAC

TGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCT
AACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAATCTACGGGGGG
GGCGCGCCAAAAAAGGGGAGGGGGGGGGGGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GG
GG
GG
GG

R7- *Pseudomonas aeruginosa*

GCGGATCGTATCGGACTACTGGGCGTAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTG
AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAG
GGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGA
GATCTTAGTGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGT
GCCTTCGGGAAGTCAAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGC
ACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCC
GCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGAC
TGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTA
ACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCCTACAGAGG
GAACCCCCAAAAACCTCCCCAAAAAAGGGGGTGGGGGTCTTTTTGTGGGAGTGGATTCAA
GAGCGGGGGTGGATTCTATTTCCGCCCGCCCCCCCCACATAGAGGGGTTAGTCCCCAGAA
CAAACACCTCTCCTTCGACCAGAGGGGAGAAGGGACAGATGGGGTGGCCTCCTTCATAA
GCAAACCTCCCCGCGCACCACCCCCCACACGGGGGGGGAGGGGAGCCCCACTTCTTAAT
GGGGTCTTTGAGGACGCTCCCCCCCCAAGAAAACACGAGCGGGGGCGCCGTGTGGTG
TGGTGTCCTCCCCCCCCACACACCAGGAAAGACAGACCTGAC

R8- *Pseudomonas sp.*

TCCGGATCGTATCGGATACTGGGCGTAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTG
AAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAG
GGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAG
ATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA
AAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
CAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTG
CCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGC
ACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCC
GCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGAC
TGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCT
AACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG
GTTACCCGTAAACTCCCCAGAAATGGGAGGGGGTGCTTTTTGGAGACGTAAACACAAAAA
GAGAGAAAGGTTTTCTTCTCCGTTCTTTCTCTAAAGTTTGAGTGTTACCAAAAAACAAA
ACCCCCCCCCCTCCACCTAGGGCGGGGAGGGAGGGTTTTGGCGTTCCTCTCCTCTTGTT
TATAATACTCCTTCGCCCTTCTCGGGGAGGAAAG

R10- *Pseudomonas putida*

TTGGACCGTTATCGGATACTGGGCGTAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGT
GAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGA
GGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGG
CGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGA
GATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAACCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGT
GCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGG
CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCA
TGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGC
CGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA

CTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTC
TAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAGG
GTAACCGTAAATTTACAAGAGATGGGTGGGGTCTTTTTGCTGCCTAGAACGGGGAACAG
AGGGGTTCCCCGCCCCCTCCTCGCAAATTTGGGTTTGTTCAAAAAAAAAACACATCTTC
CCTTCGCCGAGGGAGGGGGGGT

R11- *Pseudomonas aeruginosa*

GTGGGTTCCGTATCGGATACTGGGCGTAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGT
GAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAATACTGAGCTAGAGTACGGTAGA
GGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGG
CGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTAGCCGTTGGGATCCTTG
AGATCTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
TTAAAATACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGT
GCCTTCGGGAAGTACAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGC
ACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCC
GCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGAC
TGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTA
ACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAATCGACGAGGGGG
GCCCCAAAAAAAAAAGGG
GG
GG
GG
GGGGGGGGGGTGG
GG

R12- *Pseudomonas sp.*

CAAACGAATCCCTTTTCGGACTCAGTGTGATCAGTCCAGGTGGTGCCTCTCGCCACT
GGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACC
GTAATCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTTACATCCA
ACTTAACAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTC

TGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAATTAGCCGGAGCTTATTCTGTGCGTAACGTCAAAA
CAGCAAGGTATTA ACTTACTGCCCTTTCCTCCCAACTTAAAGTGGCTTTACAATCCGAAGAA
CTTCTTACACACGCGGGCATGGGCTGGGATCAGGGCTTTTCGCCCCATTGGTCCAAATA
TTTCCCCACTGGCTGCCCTCCCCGTAAGGAAGTCTGGGACCCGTGGTCTTCAGTTTCCA
AGTGGTGA ACTGGAATCAATCCCTCCTCCAGAACCAAGTTAACGGGAATCGGTCCGCCCTT
GGGTGGAAGCCATTTACCCTCACCCAAACAAAGCCTAAATCCCGAACCTAAGGGCTTCAA
TCCTGGATAAGCGGCAAAGGGTCCCGAAAGGGTCCCCCCTGGCTTTTTCTTCCCCGGTAA
GGGACCGGTAATGGCGGGTAATTTAAGGCGGTTTCCCTTTTTCCGAAAAACGGTTTGGTTC
CCCCCCCACCTTACCCAAGGGGCAGGAATTTCCCTTAAGGGCCATTTTATCTTCCACCCCC
CGGTTCCCGGCCCGGCCCTTGAAAATCCAAAGGGGAAGCCAAAAGGCCTTCCCCCCGGT
TCCATTCCCCGGCCTTCCGGAACCTTTTGGCCAATGGGTTGGTTTTAAAGGGCCCCCTTGG
GCCCCGCCCCAAGTCCGGTTTTCCAAAAATTCCTTTGGAAAGCCCCCAATGGGATTTCCC
AAAAAACCTTTCCTTAAAAAATAAAAAATACCCCTTCCGCGCCGCCAACTTTTTTGGTG
GTCGCTCTGTCTCTATACTACCTCATCGCACTGCTTTTGTAGCCTCCCCTTGCCGTGCTATT
TACATATCCTGTTTTTTTTCTGGGTCGGTGGACTCTTTATATGCCACCTTCTTTTCGCTCC
TTTTACTATTTTATCTTTATATATTTATATATATACGTCCCCCTATTTTGTGTTGAACCAGTT
CTCTAACGCATTAGTAATTTTTTTTTGGTATATACTCCCCTTATTGCTATTTAATACTCTCTTGA
GAGGTTGAAGATACGCAATGTTACCTTTTTTTTTTATATGTGAGTCGACGGAGCCCCCTACG
CTTCCCTGTTTAAATTAGTTTTCTGCTTATGCTAAAAATAAAATTTACTGGGCTGTTGTTA
ATATAACCTCTTTTTGCCCTTTTATTATTTTCATTTATATTATATAACTCTGTTTGATAACT
AATTTTGTATTATTAAGGATCACCTTTAATTTTTGTTTGTAGCTTATTAATATTGTTACTTTT
ATATAATTTTACTGCGCTATTTTTATATATCTAGCACCTTATTTTTCGCGTAGTTATGATTATT
ACTTATCTTCATTGCTTAGTCCTAGTGCCTGTGGCAACCTTTTCGATGTTATACATTGCT
GGTACTTAATATATTATTTTATACTTATTCTGATAATTATTATACTATTTATTACCTTTTTCTCT
TACTGTTTATGTTCTCCATTACTTAACTTACACCCGTCCCTATGCGTATGGTATGTATATT
TTTGATATAACCACTATTTAGTTATATCTACCCTACCACCCAATCCTATATTAATAATATTG
CATATATGTTAGTCAGGCCACCCTTGTAGACTTACTTTCCCTTAGTAATATAAATATATATGT
ATTTTTCTGTCTTTCTTTTTATTTTACCAAGATTTCTTTATGTTTTAGCCATATCGCCTTTTAT
TACGTTCCCTATATCTACTTGAATAACCACGCTAGCTCTTTATACGCACCTGTTTTTTGAAAA
GATTTTGTGTGTTCTCCTTCGCTGTACGTGCCATTCTTCCGCCCTTTTATATACACGTGCG
TT

R13- *Pseudomonas aeruginosa*

GTGGGTGGTTATCGGATTACTGGGCGTAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGT
GAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA ACTGCATCCAAA ACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGA
GGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGG
CGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTAGCCGTTGGGATCCTTG

AGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
TTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGT
GCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGC
ACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCC
GCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGAC
TGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTA
ACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAATCTAGAGGAGAG
CGCGCCAAAAAAAAAAGAGGGGGGGGGGGGGCGGGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCCCCCGCCCCCCCCCGGGGGGGGGCGGCCGCGC
CCCCGCGCCCCCCCCCGCCCCCCCCCGGCGCCGGGCGGGGCGCGGGG

R14- *Pseudomonas sp.*

TTAAGGACCGTATCGGACTACTGGGCGTAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGT
GAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGA
GGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGG
CGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGA
GATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGT
GCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGG
CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACATAGGGTTGCCAAGCC
GCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCAAC
TGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGCGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAAGTC
TAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACTGTGTGATTCATGGACTGGGGCTGAACTCCTAACTA
GGGCTACCTGTAAAGCTGCAATCAAATACGGACCTGGGCTCTTTCTGAAACCTATAACACC
TAGAAGACCAGAAGGGTTTAACCCCCCCCCCGCCCCCTACAAAATGGGGGTTTTTGTCCAA
GGAAAAATACTACTTCTTTTTCACAGTTGCGGGGCGGAGAGGTGTGTTGTTTTCTTACCCC
TATTAGAAATTTTCCCCCCCCCTCAACTGCAAAGAAGGGGGGAGTTTTAATCTTCCCTCT
CTTTTGTGCGTTGATTACTTACTTATATCTATATGCCGTTTTAGTCTGAGCGGGGGGCGCG
GCTCTGTGGGTTGTACCCCCCCCCCTCTGTATGTGTTTATTTATTATCTAATACGACGGGA

GCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGG
CACTCTAAGGAAACTGCCGGTGACAAACCGGAAGAAAGTGGGGATGACGTCACGTCCTCA
TGGGCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCAGCACACAGGGTTGCCAAGC
CTCCAGGTGCAACTAATATCACAAAACCGACTGGTAATCCGATCCACATCTCGAACTCCAA
ACGCCTGAAGACCGAATCCCCTAGTAATCCCGGAATCACAATGTCCACGGTGAATACGTTT
CCGGGCCTTGTACACACCGTCCGTACATCATGGGAAGTGGGTTGCACCAGAAAGTAGGC
TACTCCAACCTTTCGGGAAGGAGCGGTCAACCACTGGTGATACTTCATCGACTGGAGCATT
ACTTCCTTAACACTGGGTCTTCGGTCAAATTCGTTCTTTAGGGCGTACTGTTGTTTTCTTAT
CTGCTCGTCGCCTACACCTAAATTGGGCGTCGTAGCCTATTTGATATGTCGTGCTACCTCT
TTTTTGTAAGTATAGCTTATTCGCTTTTTTTTTACACGTGCGACTTATACCTTCTTTACTG
CGCGGCGACGGTGCTGCCTGCTCGGTTTACCTTTCGGCTTTTTTTTTACCTTCCTAGTATAAT
TATATCTTAACGGTAATCTACTATCTACTTATTAACCGTTTAACGGCGGGGCACCGCTGCG
CCCTCTACTGCTGATTTATTGTATGATGCCGCTTGTATTTTATTAATTATTATAAATTGTCCCT
ATTTCCACGTTACCGAACCCCGCCGTGTATCTTTACACGTGTTATTGTTTCTGACCCCC
ACTCCCTGATACTCTTGTGGCGCCCGCCCTTATCAC

Anexo 3. Galería de Fotos



Figura 10. Prospección de campo para recabar información sobre el uso de glifosato en la actividad agrícola.

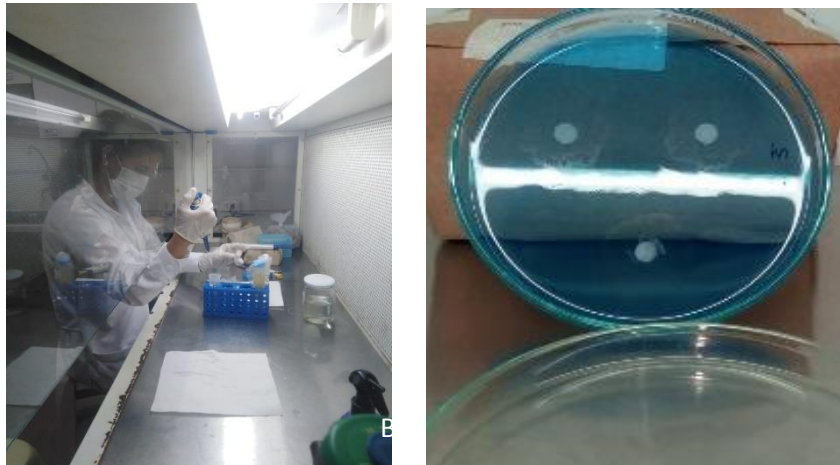


Figura 11. Aislamiento in vitro de bacterias presentes en el agua residual agrícola



Figura 12. (A) Extracción de ADN de bacterias aisladas del agua residual agrícola (B) cuantificación de ADN bacteriano.