

OPTIMIZACION DE UN BIOSENSOR PARA LA CUANTIFICACION DE GLIFOSATO

Lopez, M.^{1,2}; Masotti, F.¹; Gottig, N¹; Checa, S^{1,2}; Garavaglia, B.^{1,2}; Ottado, J¹

¹IBR | CONICET, ²FBioyF | UNR

Palabras claves: Glifosato, agroquímicos, biosensor, biología molecular, microbiología

Introducción

El glifosato (GP) es un fosfonato sintético, característico por tener una estructura estable debido a la presencia de un enlace CP. Es el herbicida mas frecuentemente usado a nivel mundial, actúa inhibiendo la enzima EPSPS de la ruta del shikimato en plantas interfiriendo con la síntesis de aminoácidos aromáticos y metabolitos secundarios, esenciales para el crecimiento. El desarrollo de plantas modificadas genéticamente que producen una enzima recombinante resistente a GP permitió la adopción de herbicidas basados en GP (GBH) a escala global sin mediar su impacto ambiental. Proveniente de una serie de aislados bacterianos obtenidos de suelos contaminados con extensivas aplicaciones de GBH, se obtuvo la cepa de *A. tumefaciens* CHLDO, que mostró ser eficiente en biorremoción de GP en medios líquidos, utilizando el GP como fuente de fósforo. La secuenciación genómica de esta cepa reveló un clúster de genes (*phn*) que codifican la enzima CP liasa, responsable de la degradación de GP. Posterior análisis *in silico* de las secuencias promotoras arrojó 6 regiones intergénicas con la capacidad de responder a la presencia de fosfonatos. En este trabajo realizamos la optimización de una cepa biosensora que utiliza una fusión transcripcional a GFP de un promotor de *phn* que responde a fosfonatos y agregando un copia del represor, obtuvimos una mejor respuesta y ajuste para la cuantificación del herbicida.

Metodología

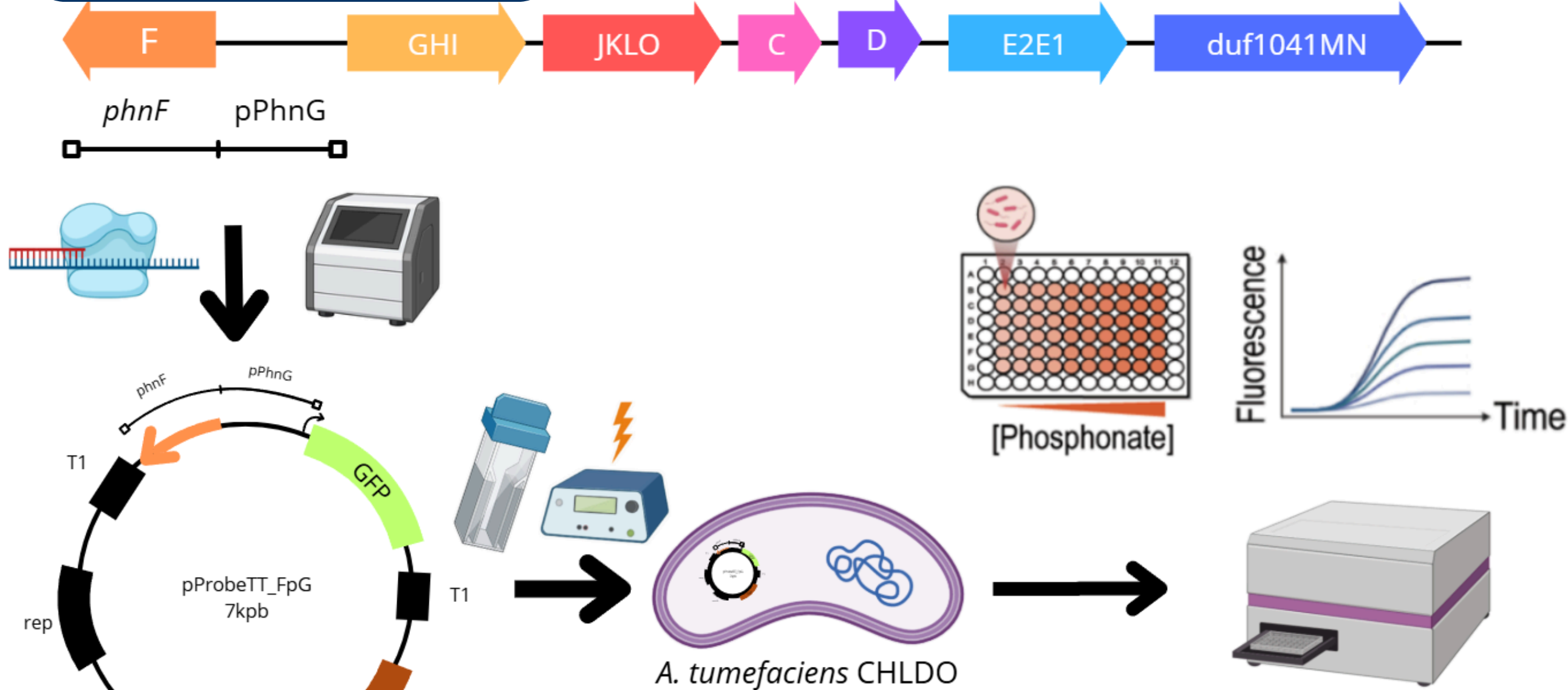


Imagen 1. Descripción ilustrativa de la metodología utilizada en este trabajo.

Diagrama del biosensor

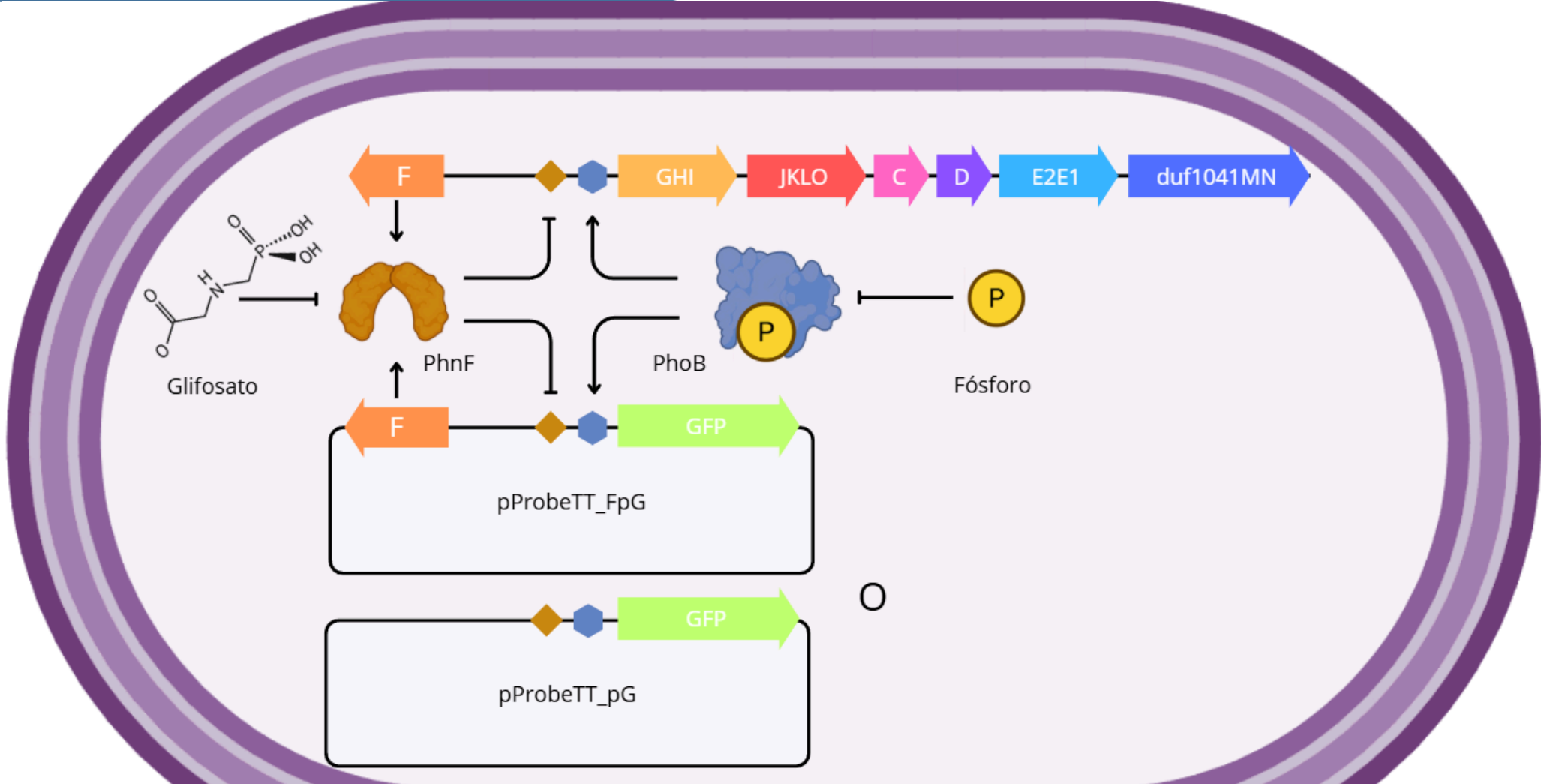


Imagen 2. Diagrama del las cepas biosensoras de *A. tumefaciens* CHLDO

Resultados y discusión

Crecimiento

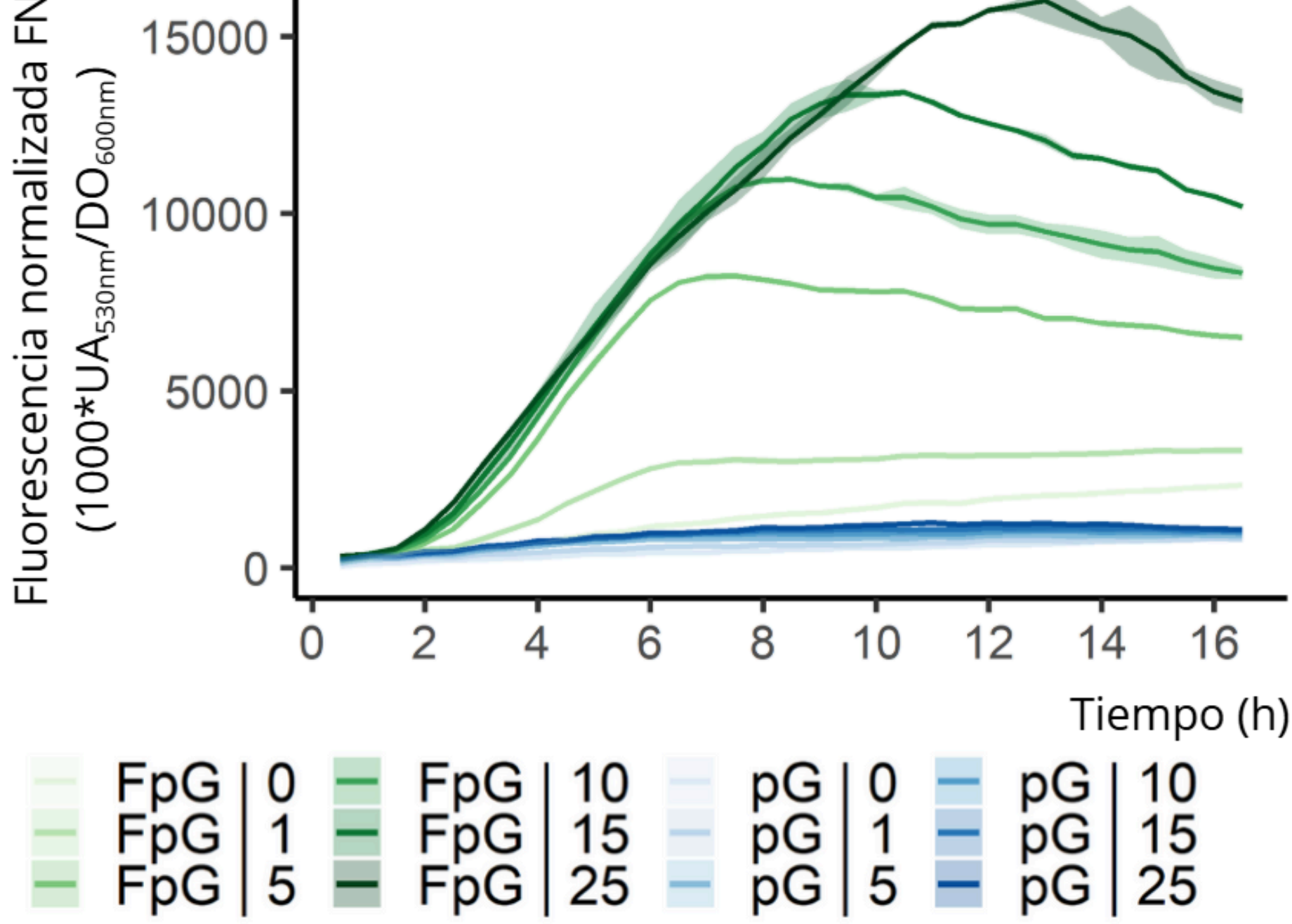


Gráfico 1. Curvas de fluorescencia normalizada en función del tiempo para las cepas

Respuesta del biosensor

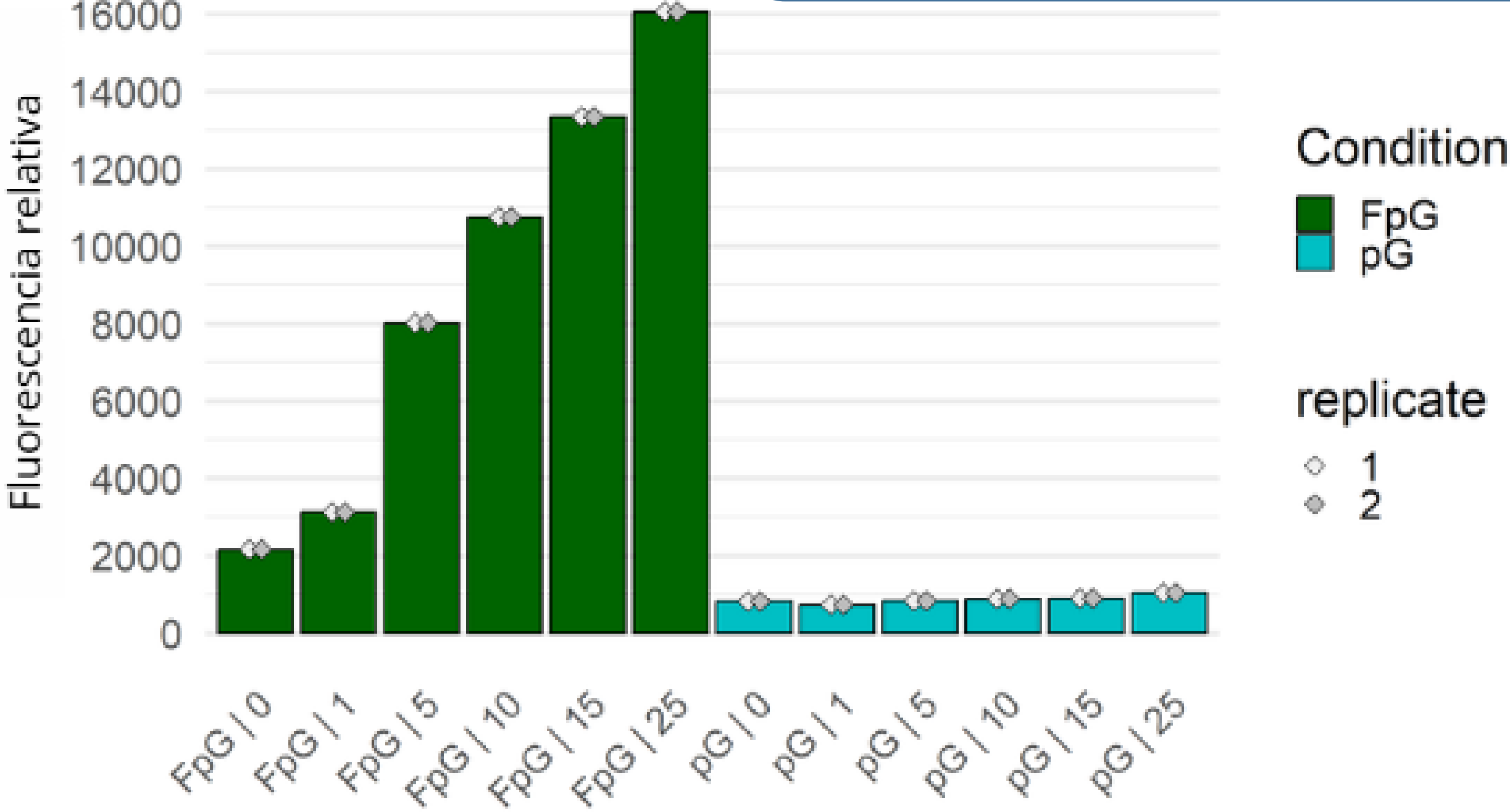


Gráfico 2. Fluorescencia relativa con respecto a la concentración de GP para ambas cepas

Parámetros del biosensor

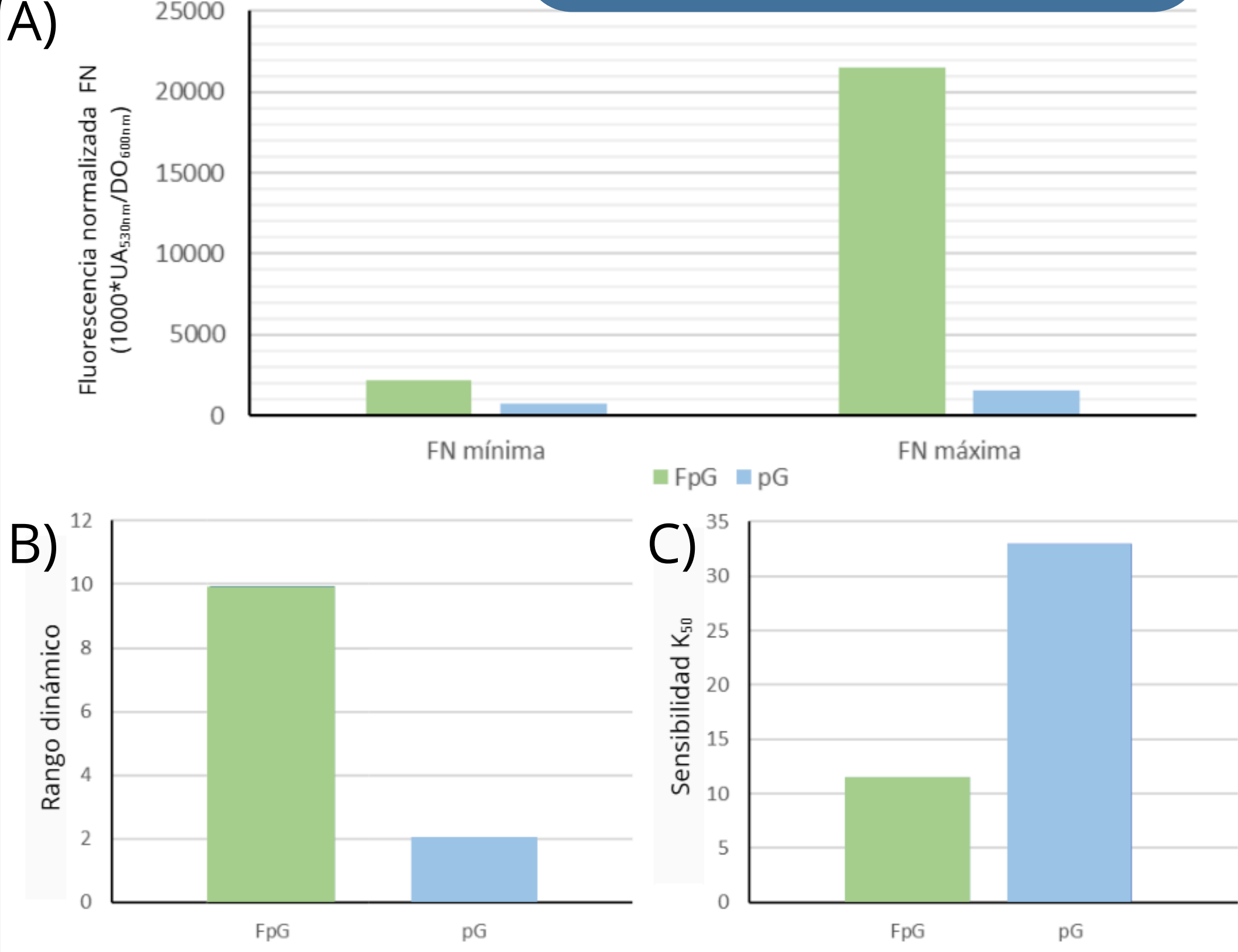


Gráfico 3. A) Comparación de la fluoescencia normalizada mínima y máxima para las dos cepas. B) Rango dinámico estimado para ambos biosensores. C) Descripción de la sensibilidad (K_{50})para las cepas FpG y pG

Discusión

Los resultados obtenidos demuestran que el biosensor que posee una copia extra del represor en el plásmido aumenta el rango dinámico de 1.97 a 9.95, disminuye la K_{50} de 33 a 11.5 μM y aumenta la fluoescencia máxima más de 14 veces, con respecto a la versión que carece del represor, permitiendo una mejor sensibilidad a fosfonatos.

		[GP] μM					
Curva de calibración		0	1	5	10	15	25
Biosensor	FpG	0	1	5	9	15	27
	pG	0	0	1	5	7	20

Tabla 1. Comparación de las estimaciones de concentración de GP (en μM) para ambos biosensores

Conclusión

En conclusión, logramos obtener una cepa biosensora de *A. tumefaciens* CHLDO optimizada, al agregar una copia extra del represor en el plásmido, lo que mejora las cualidades del biosensor, permitiendo una mejor cuantificación de GP. La cepa demuestra ser aplicable en muestras de laboratorio y podrá ser utilizado en muestras ambientales.