

Análisis del herbicida (Metribuzin)

Medio de cultivo (08/03/10)

Agar papa glucosado:

250 gr de papa se hierven en 1 L de agua destilada, durante 1 h a baño María. Se filtra y al filtrado se agregan 20 gr de agar y se cocina durante otros 20 min en baño. Luego se agregan 20 gr de glucosa, se mezcla y se esteriliza.

El pH del medio es 5,6.

Se agregó estreptomina en una concentración de 200 mg. L⁻¹. Con esto se pretende favorecer el desarrollo de hongos por sobre el crecimiento bacteriano.

Agar Nutritivo

Peptona de carne 5,0 gr; extracto de carne 3,0 gr, Agar 18 gr.

Se ajustó el pH a 7, 0.

Se suplemento con el fungicida Maxim en una concentración final de 0,35 µg.ml⁻¹.

Diluciones y plaques (09/03/10)

Se realizaron 6 diluciones de cada muestra.

Muestra 1: sobrenadante de producto alterado

Muestra 2: producto con separación de dos fases

Muestra 3: producto en buen estado.

Rótulos de las diluciones:

Dilución 1/10: -1

Dilución 1/100: -2

Dilución 1/1000: -3

Dilución 1/10000: -4

Dilución 1/100000: -5

Dilución 1/1000000: -6

Se plaquearon las 6 diluciones de cada muestra. Por cada dilución se sembraron 2 placas con medio Agar nutritivo (c/Maxim) y 2 placas con medio Agar papa glucosado (c/estreptomicina). En cada placa se sembró 100 µl de la dilución correspondiente. Las placas se incubaron a 28°C desde el día 09/03/10 a las 10 h.

Se realizó una tinción Gram de cada colonia diferente que creció en medio Agar nutritivo con fungicida, para cada una de las muestras de las diluciones que presentaron desarrollo de colonias y se repicaron para obtener colonias aisladas.

Resultados:

En la muestra 1 solo aparecieron dos tipos de colonias amarilla (clara y oscura) en la dilución (-1) de la placa con medio Agar nutritivo (16/03/10). El mayor crecimiento y variedad de colonias se observó en las placas de la muestra 3 en todas las diluciones.

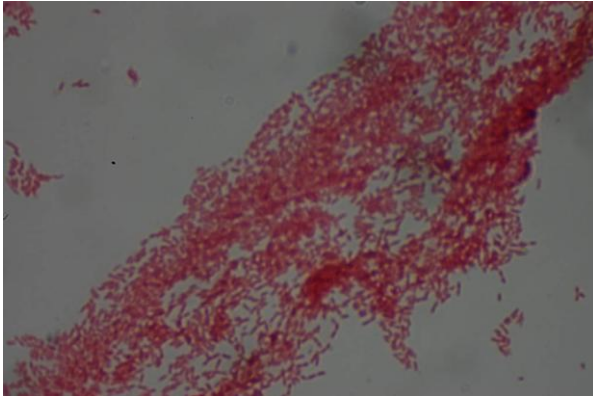
No se observó desarrollo de hongos en las placas sembradas con medio Agar papa glucosado.

En paralelo se preparó un medio conteniendo como única fuente de carbono goma xántica además de los demás componentes del medio YEM (s/manitol). Un litro de este medio preparado con el agregado de 5 g/l de goma xántica se diluyó $\frac{1}{4}$ veces y se plaqueo luego del agregado del agar. En el mismo se plaquearon las dilución mencionadas anteriormente por duplicado. No hubo crecimiento de microorganismos en ninguna dilución plaqueada de las tres muestras en estudio.

MUESTRA N° 1:

Sobrenadante del producto degradado

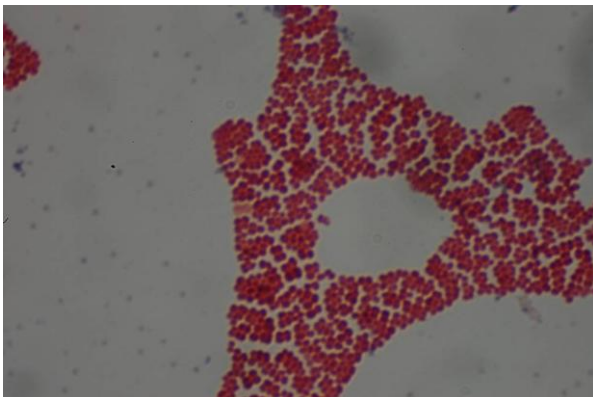
Solo en la dilución -1 crecieron colonias amarillas



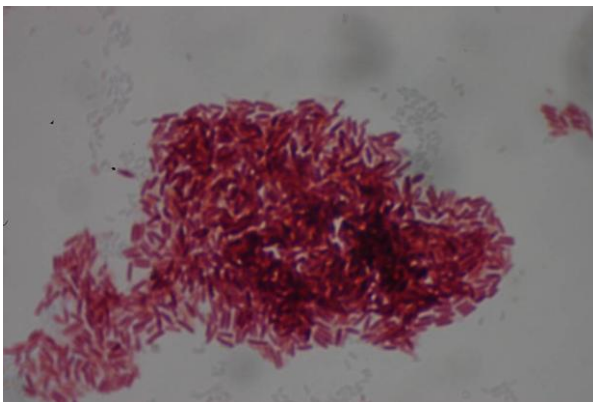
MUESTRA N° 2:

Producto parcialmente degradado (se observan dos fases)

Dilución -6. Colonias amarillas claras



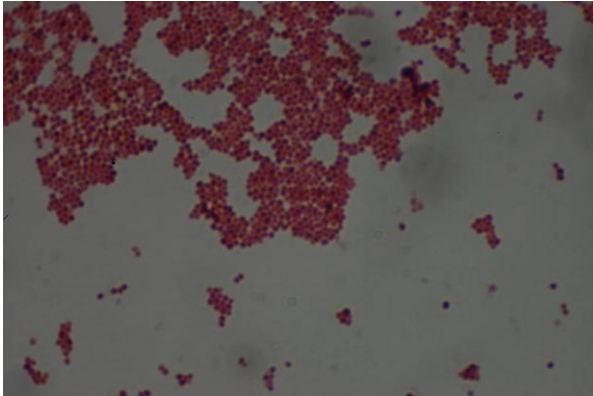
Dilución -6. Colonias blancas



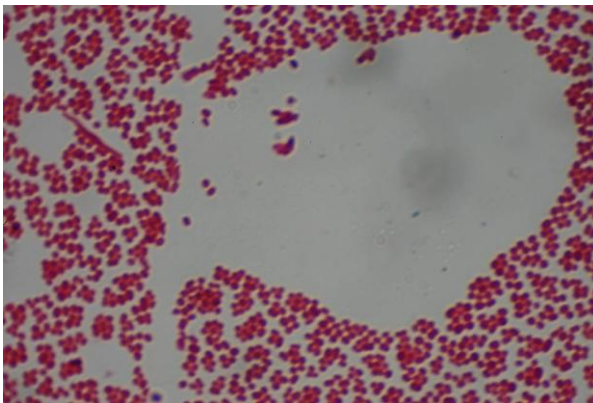
MUESTRA N° 3:

Productos en buen estado

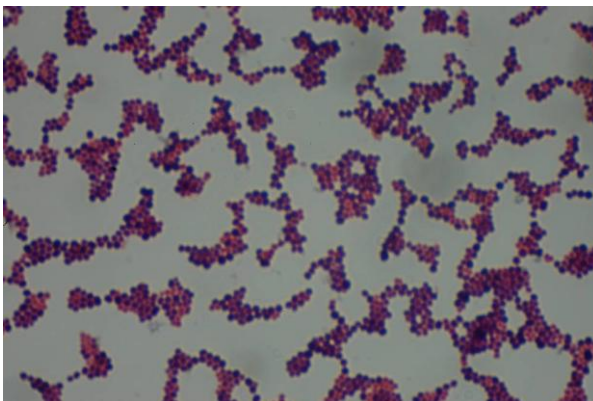
Dilución -1, colonias blancas.



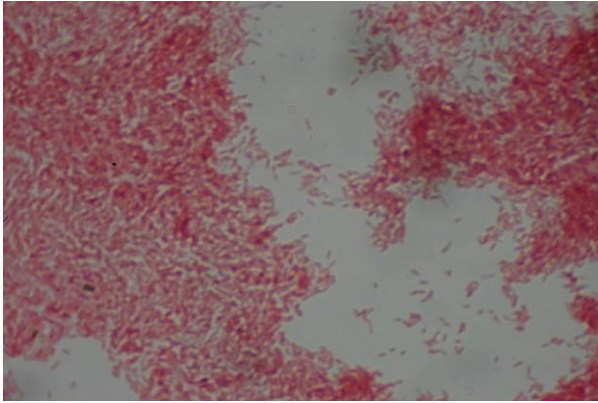
Dilución -1 colonias blancas transparentes



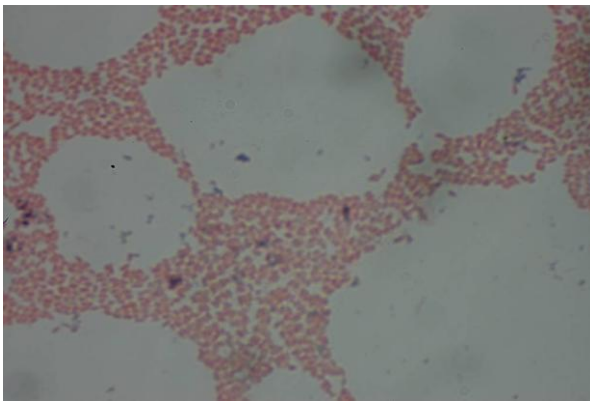
Dilución -1, colonias amarillas claras



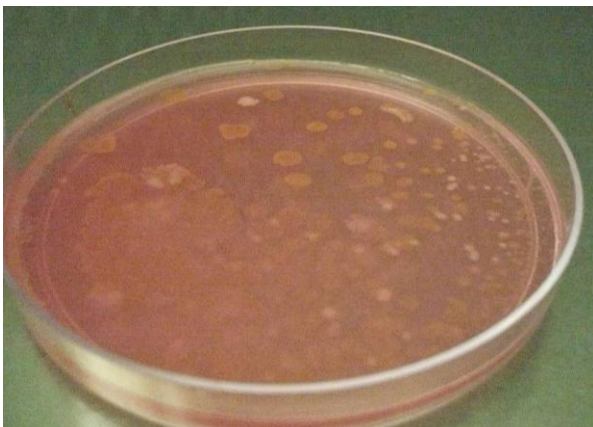
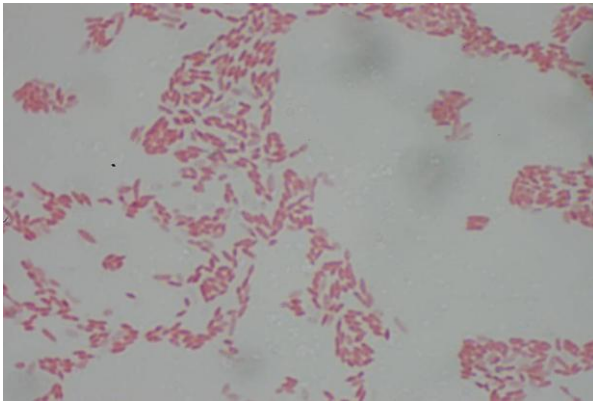
Dilución -2, colonia blanca grande única en la placa



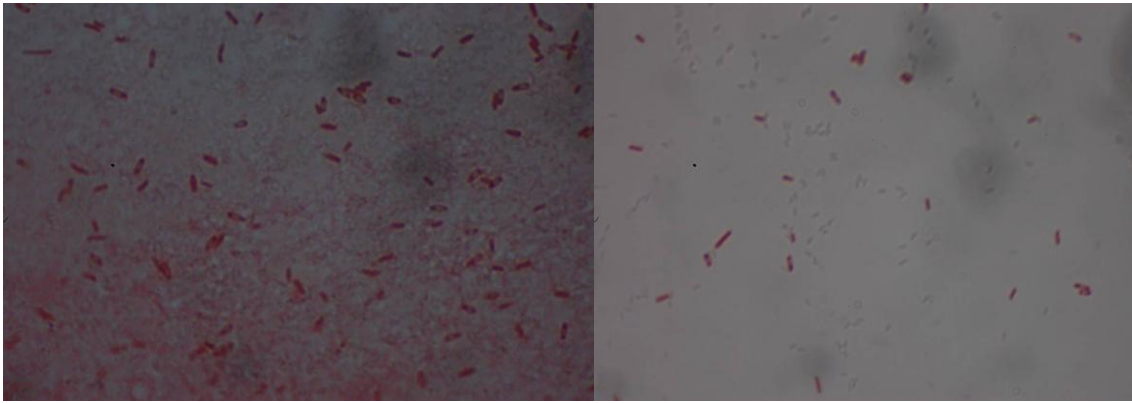
Dilución -2, colonias blancas transparentes



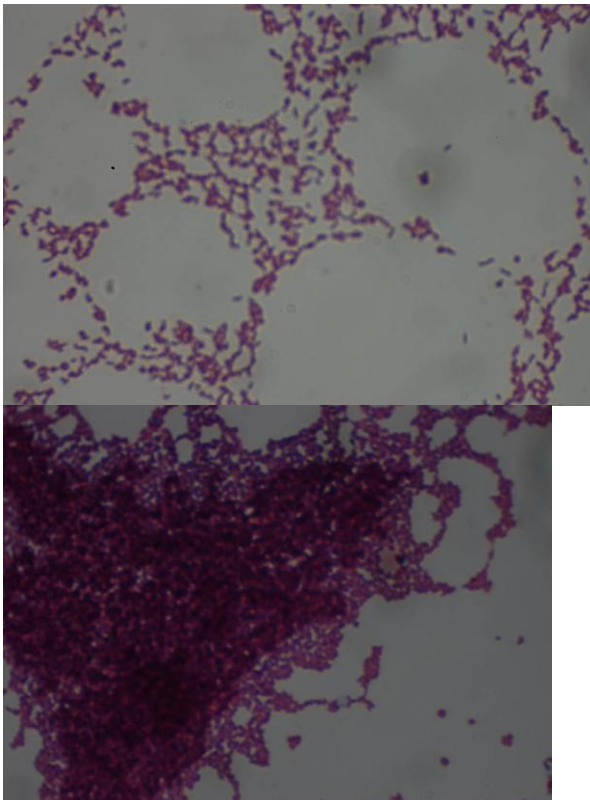
Dilución -2, colonias amarillas transparentes



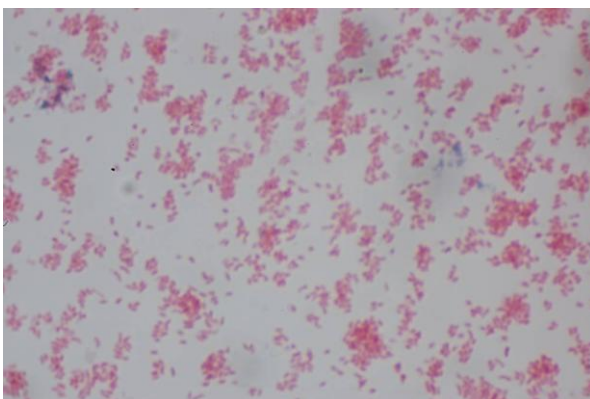
Dilución -3, colonias amarillas



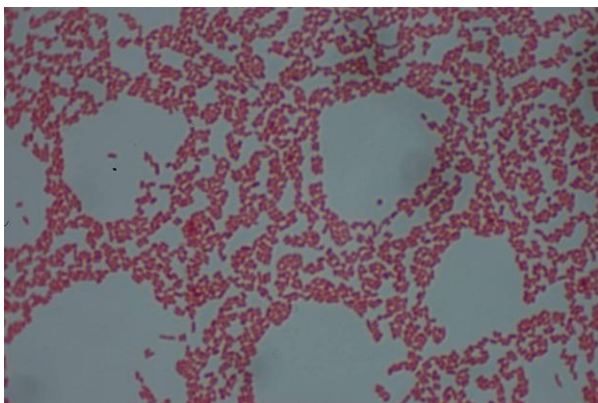
Dilución -4, colonias amarillas lisas



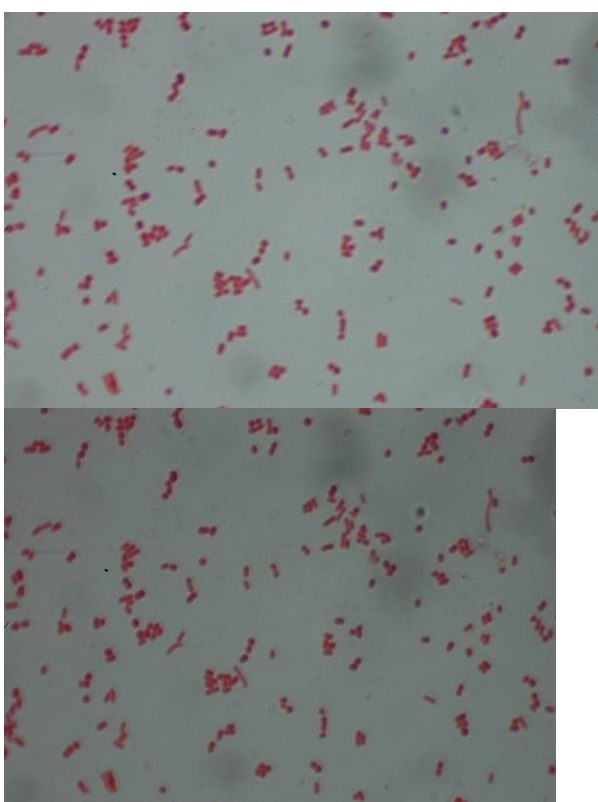
Dilución -4, colonias blancas rugosas

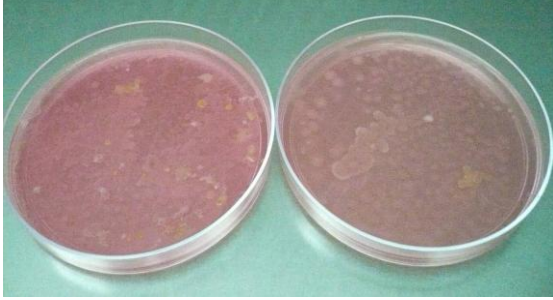
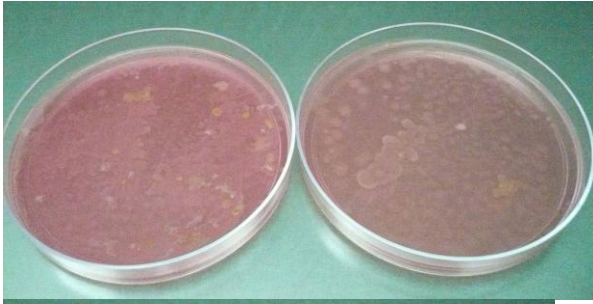


Dilución -4, blanca transparente

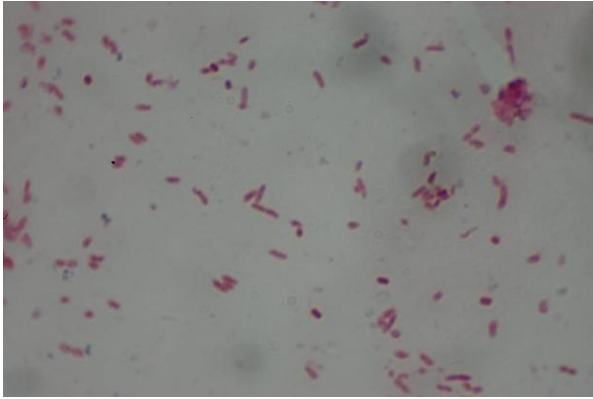


Dilución -5, blanca transparente

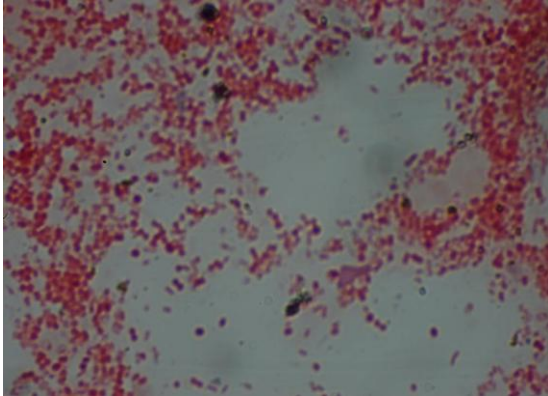
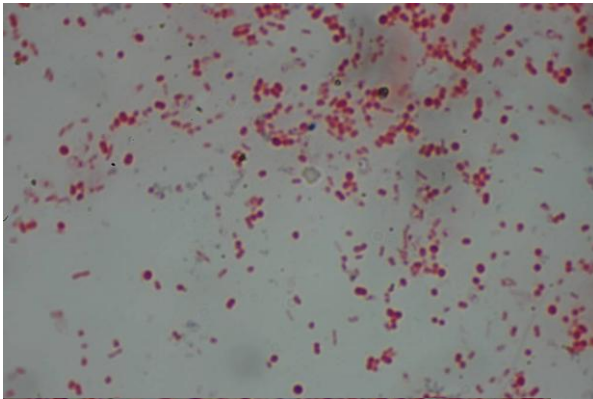




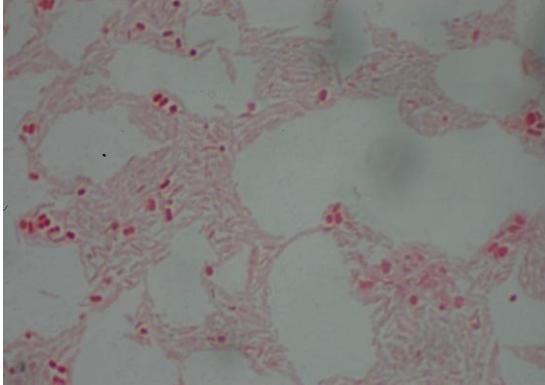
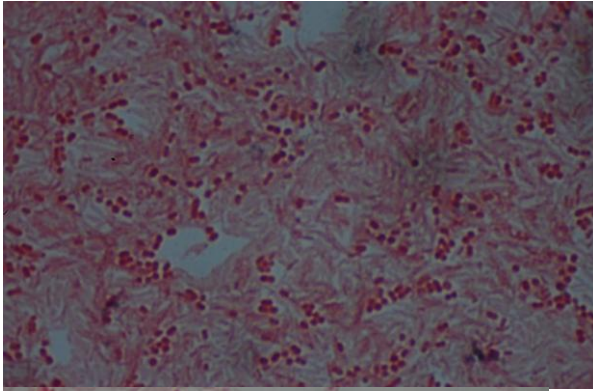
Dilución -5, colonias amarillas lisas



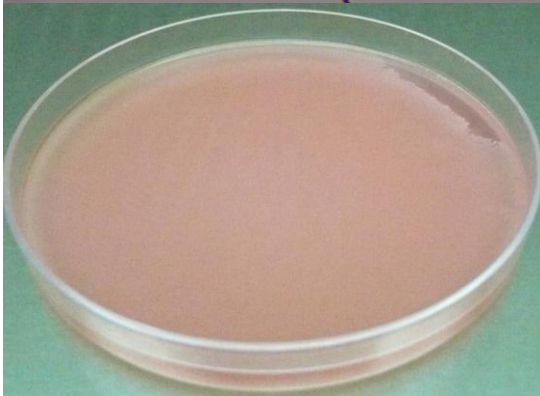
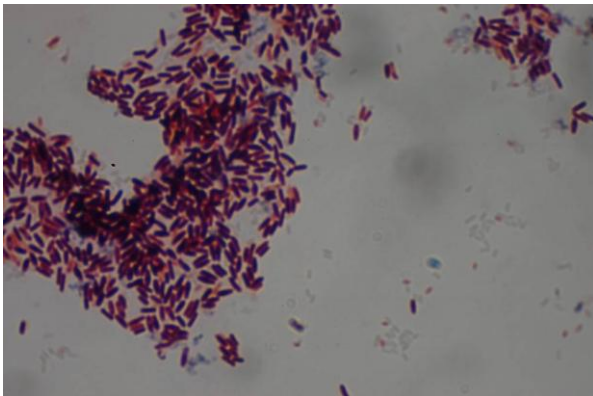
Dilución -5, colonias amarillas rugosas



Dilución -5, colonias blancas transparentes



Dilución -6, placa completamente cubierta



Medio de cultivo:

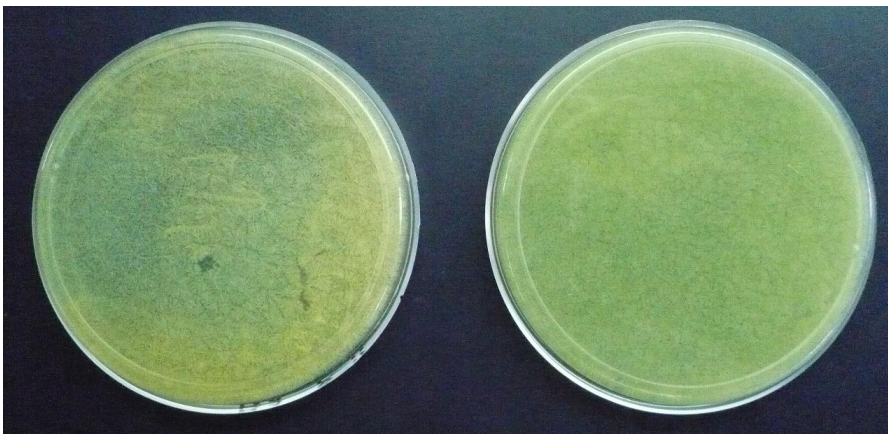
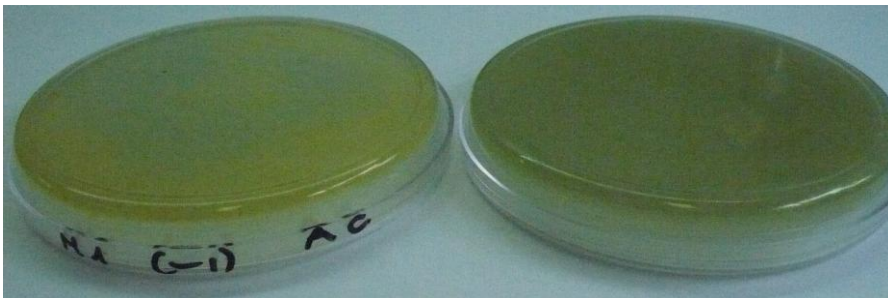
Se preparó un medio mínimo al que se le adicionó como única fuente de carbono 0,5% del producto en análisis, y 25 µg/ml de azul de bromotimol (indicador de pH). El pH del medio fue de 6,9 y el medio de color verde cambia a color amarillo cuando el crecimiento bacteriano acidifica el medio, en caso contrario el color del medio alcalinizado es azul.

Se plaqueo en cada placa cada colonia observada en las 6 diluciones de las tres muestras (producto en buen estado, producto con dos fases y sobrenadante del producto degradado). De cada colonia a su vez se realizó una reacción BOX para caracterizar los cultivos.

Se observó crecimiento que acidificaba en medio 24 hs después de la siembra en las diluciones que se muestran a continuación para cada muestra.

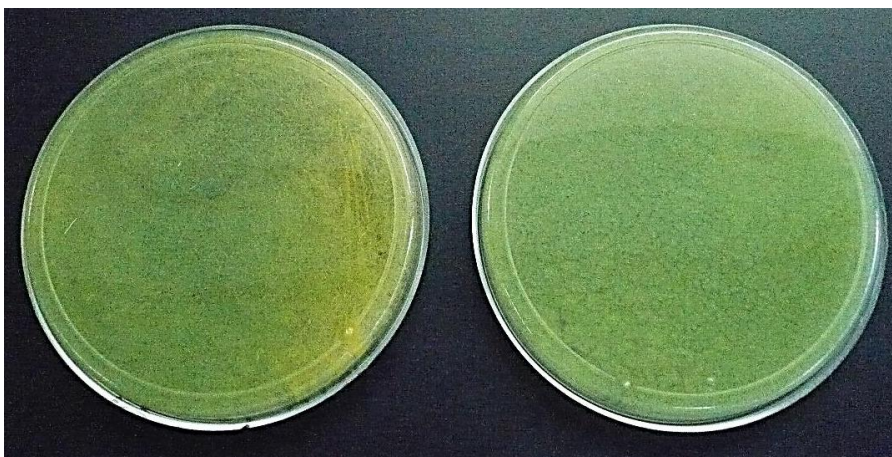
Muestra 1 (sobrenadante del producto degradado):

dilución -1 (1/10) (colonia amarilla clara)



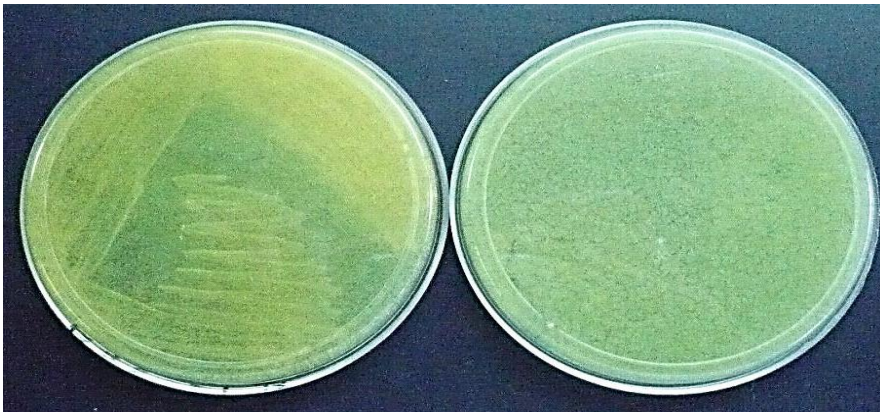
Muestra 2 (producto con dos fases):

Dilución -6 (colonia amarilla)

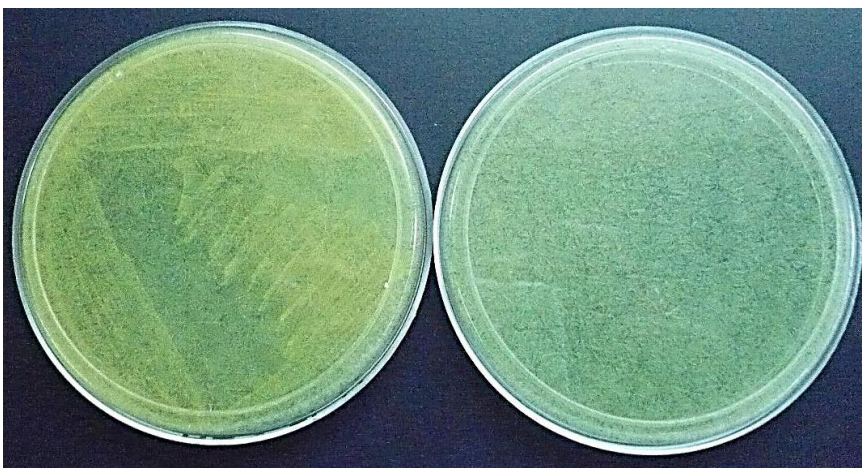


Muestra 3 (producto en buen estado)

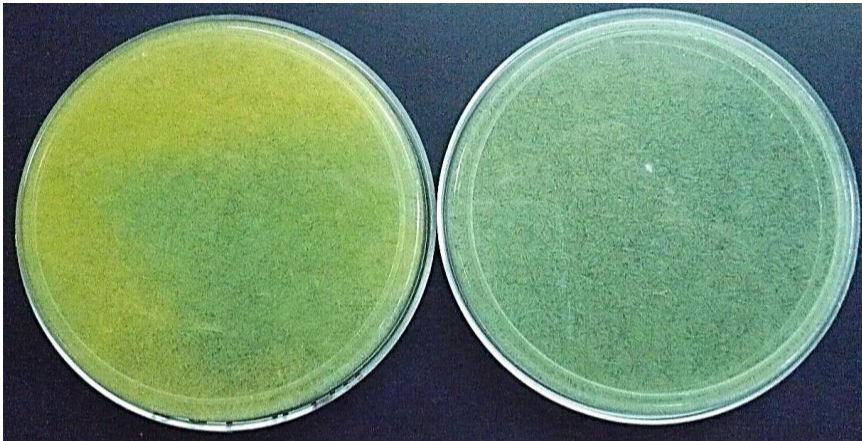
Dilución -2 (colonia blanca)



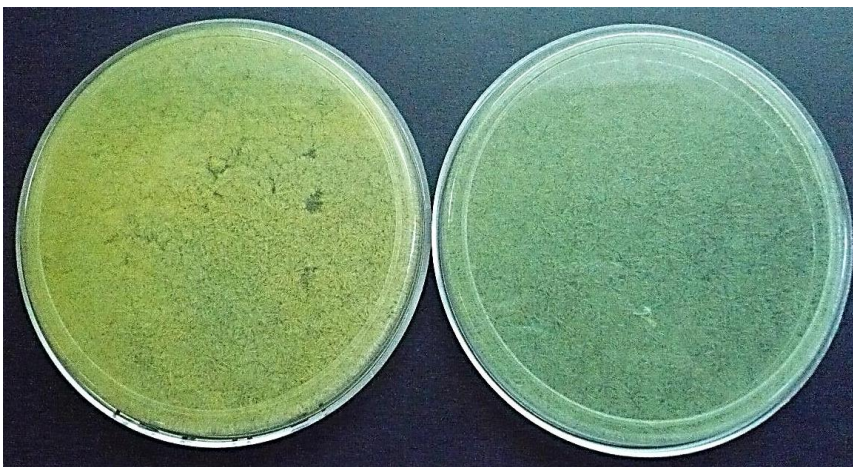
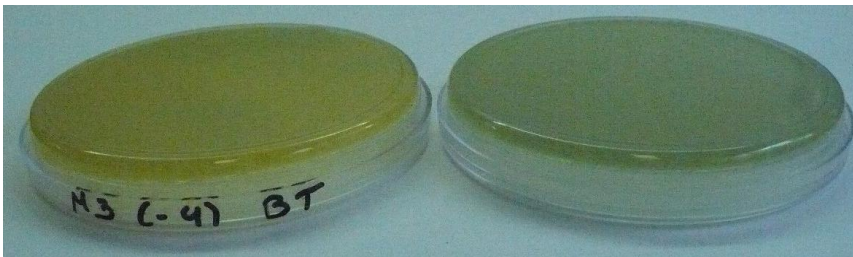
Dilución -2 (Colonia amarilla)



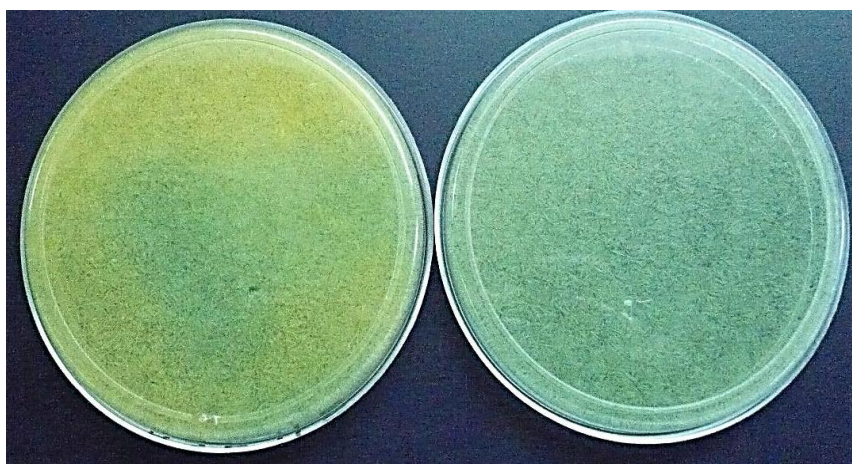
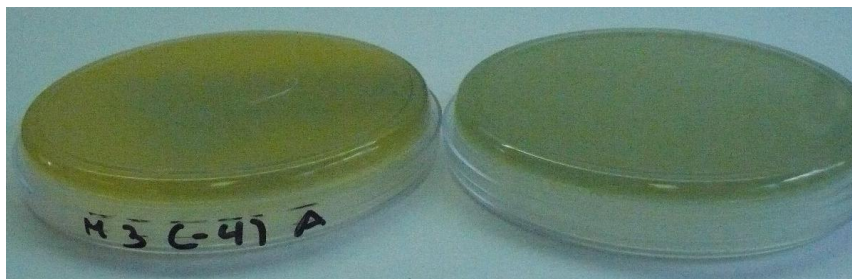
Dilución -4 (colonia blanca amarillenta)



Dilución -4 (colonia blanca transparente)



Dilución -4 (colonia amarilla)



Ensayo con biocidas

Biocidas

Biocida A: Delcide Bit 20 (1,2-benzisotiazolin-3-ona/Min. 20%).

Biocida B: Delcide TX-C (5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona + 2-metil-4-isotiazolin-3-ona + Bronopol).

Biocida C: Formaldehido.

Biocida D: Newcide 2170 BC (cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona + metil-4-isotiazolin-3-ona).

Concentraciones de biocidas en el medio de cultivo a ensayar: 0,00%; 0,05 %, 0,15% y 0,25%.

Muestras de herbicida (Metribuzin), a las que se les aplicó cada biocida:

Muestra 1: sobrenadante del producto degradado.

Muestra 2: producto con separación de dos fases (dilución 1/10).

Muestra 3: producto en buen estado (dilución 1/10).

Controles (21/04/10):

- Se prepararon las siguientes diluciones de las tres muestras de herbicida, y se plaquearon por duplicado en medio Agar nutritivo pH 7,00 con y sin Maxim (0,35 µl/ml):

(Se plaquearon 100 µl de cada dilución)

Muestra 1 (sobrenadante): -1; -3 y -5.

Muestra 2 (producto con dos fases): -1; -3 y -5.

Muestra 3 (producto en buen estado): -1; -3 y -5.

- Además en medio agar nutritivo con y sin Maxim se plaquearon 100 µl de cada biocida por duplicado.

Biocida A: Delcide Bit 20 (1,2-benzisotiazolin-3-ona/Min. 20%).

Biocida B: Delcide TX-C (5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona + 2-metil-4-isotiazolin-3-ona + Bronopol).

Biocida C: Formaldehido.

Biocida D: Newcide 2170 BC (cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona + metil-4-isotiazolin-3-ona).

Ensayo:

- Considerando que el biocida será agregado al producto (herbicida) en las concentraciones que resulten óptimas para controlar el desarrollo microbiano, se prepararon medios de cultivos con las concentraciones indicadas de los biocidas de modo que el herbicida este siempre en contacto con el biocida. Se plaquearon medios de cultivos agar nutritivo pH 7.0 a los que previamente se adicionó cada biocida para reproducir las concentraciones finales de biocida en el medio que se detallaron antes.
- Se sembraron por duplicado 100 µl de la muestra 1 y el mismo volumen de las diluciones 1/10 de las muestras 2 y 3 en las placas con agar nutritivo

conteniendo cada biocida en cada una de las concentraciones detalladas.
(28/04/10)

Todas las placas se realizaron por duplicado.

Herbicida/Biocida	A	B	C	D	Concentración Biocida
M1	M1A1	M1B1	M1C1	M1D1	0,05 %
M1	M1A2	M1B2	M1C2	M1D2	0,15 %
M1	M1A3	M1B3	M1C3	M1D3	0,25 %
M2	M2A1	M2B2	M2C2	M2D2	0,05 %
M2	M2A2	M2B2	M2C2	M2D2	0,15 %
M2	M2A3	M2B3	M2C3	M2D3	0,25 %
M3	M3A1	M3B1	M3C1	M3D1	0,05 %
M3	M3A2	M3B2	M3C2	M3D2	0,15 %
M3	M3A3	M3B3	M3C3	M3D3	0,25 %

Las placas se incubaron a 28 °C.

Resultados:

Controles:

- En ambos medios de cultivo a los que no se agregó ningún biocida, hay desarrollo microbiano, como sucedió en los primeros ensayos.
- En las placas sembradas únicamente con biocidas no hubo desarrollo microbiano.

Ensayo:

- Los 4 biocidas en todas las concentraciones ensayadas logran inhibir el desarrollo microbiano observado en las placas controles en las que se sembraron las muestras en ausencia de biocidas.

Aislamientos obtenidos del primer ensayo:

Luego del primer ensayo con el herbicida (08/03/10), los aislamientos obtenidos de las tres muestras de herbicidas recibidas se mantuvieron puros en placas. Se preparó de cada uno de los 18 aislamientos que surgieron de las 3 muestras en estudio, una suspensión bacteriana, de la que se sembraron 20 µl en cada tratamiento.

Por cada biocidas se prepararon placas con las siguientes concentraciones 0,05% y 0,15%, y se sembraron 20 µl de las suspensiones bacterianas.

Resultados:

Los 4 biocidas en la concentración 0,15% inhibieron el desarrollo de los 18 aislamientos.

La cepa 2 y 18 aisladas de la Muestra 1 lograron desarrollar en los biocidas A (Delcide Bit 20) y C (Formaldehido) en concentración 0,05%.

Desarrollo de microorganismos anaerobios:

Con el objetivo de evaluar crecimiento de microorganismos con baja tensión de oxígeno presentes en el herbicida.

Medios de cultivo empleados:

Agar nutritivo y medio mínimo con metribuzin como única fuente carbonada.

Se plaquearon 100 µl de cada muestra (M1, M2 y M3) del herbicida en ambos medios de cultivo (por duplicado). Las mismas se incubaron en jarra de anaerobiosis a 28 °C.

Resultados:

Muestra	Agar nutritivo (ácido)	Medio c/Metribuzin
M1	No hubo desarrollo	2 hongos con micelio tabicado y con esporas verdes
M2	No hubo desarrollo	3 hongos con micelio tabicado con esporas verdes
M3	2 hongos blancos con micelio tabicado. No se observan esporas.	1 Colonia amarilla de levaduras y 1 colonia bacteriana blanca mucosa de cocos.