



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Centro de Investigación en Biotecnología

INFORME FINAL DEL PROYECTO

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS AGRÍCOLAS CONTAMINADOS POR GLIFOSATO MEDIANTE BIODEGRADACIÓN BACTERIANA Y EL TRATAMIENTO DE SUS RESIDUOS

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT)

NÚMERO DE PROYECTO 315903

RESPONSABLE TÉCNICO

DR. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLÍS

PROFESOR INVESTIGADOR DE TIEMPO COMPLETO

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
3. JUSTIFICACIÓN	7
4. OBJETIVO GENERAL.....	8
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
5. ESTRATEGIA METODOLÓGICA.....	9
5.1. Glifosato	9
5.2. Metal pesado.....	9
5.3. Obtención de inóculo de <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3 y <i>Burkholderia cenocepacia</i> CEIB S5-2	9
5.4. Evaluación de la capacidad de crecimiento y degradación de glifosato por las cepas bacterianas.....	10
5.5. Concentración Mínima Inhibitoria en presencia de glifosato.....	11
5.6. Análisis del transcriptoma de dos cepas de <i>Burkholderia</i> expuestas al herbicida glifosato.	11
5.7. Estrategia de biodegradación de glifosato mediante el uso de camas biológicas.....	13
6. RESULTADOS OBTENIDOS	14
6.1. Cinéticas de crecimiento de <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3 y <i>Burkholderia cenocepacia</i> CEIB S5-2 en caldo de soya tripticaseína	14
6.2. Cinéticas de crecimiento de <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3 y <i>Burkholderia cenocepacia</i> CEIB S5-2 en caldo de soya tripticaseína y glifosato comercial	16
6.3. Cinéticas de crecimiento de <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3 y <i>Burkholderia cenocepacia</i> CEIB S5-2 en MMSM y glifosato comercial.....	18



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

6.4. Cinéticas de crecimiento de <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3 y <i>Burkholderia cenocepacia</i> CEIB S5-2 en MMSM y glifosato comercial.....	20
6.5. Cinéticas de crecimiento de <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3 y <i>Burkholderia cenocepacia</i> CEIB S5-2 en MMSM y glifosato grado analítico.....	22
6.6. Evaluación de la resistencia a glifosato por <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3 y <i>Burkholderia cenocepacia</i> CEIB S5-2.....	24
6.7. Evaluación de la capacidad degradación de glifosato por <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3 y <i>Burkholderia cenocepacia</i> CEIB S5-2	27
6.8. Análisis del transcriptoma de <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3 y <i>Burkholderia cenocepacia</i> CEIB S5-2 expuestas a glifosato.....	28
6.9. Estrategia de biodegradación de glifosato mediante el uso de camas biológicas.....	31
7. CONCLUSIONES	32
8. CUMPLIMIENTO DE LOS PRODUCTOS COMPROMETIDOS EN EL PROYECTO	34
FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS.....	37
PRODUCTOS ADICIONALES AL PROYECTO.....	37
PARTICIPACIÓN EN SIMPOSIO	37
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

1. INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas han generado diferentes impactos negativos a todos los niveles de organización biológica, entre ellos la liberación de una gran cantidad de materiales y sustancias contaminantes. Se estima que, a nivel mundial, más de mil millones de libras (450 millones de kilogramos) de sustancias potencialmente tóxicas se liberan anualmente al aire, al agua y al suelo. A lo largo de la historia se han generado más de seis millones de compuestos químicos denominados como xenobióticos, adicionalmente cada año se generan más de 1,000 nuevos compuestos, actualmente entre 60-95 mil sustancias químicas se encuentran en uso comercial (Shukla et al., 2010; Brusseau y Artiola, 2019).

Entre este vasto catálogo de productos químicos se encuentran los plaguicidas, definidos como cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se utilizan para controlar diferentes tipos plagas, en la agricultura moderna utiliza ampliamente, en la mayoría de las áreas de producción de cultivos, a los pesticidas químicos para controlar las plagas de los cultivos, evitando la disminución del rendimiento y la calidad de los productos agrícolas, así como en el procesamiento, almacenamiento, transporte y comercialización de alimentos (FAO, 2015; Bonner y Alavanja, 2017; Damalas, 2019; FAO, 2015; Sheahan et al. 2017). Por lo que, los plaguicidas son agroquímicos muy importantes para la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos (FAO, 2002; Engindeniz, 2008). Sin embargo, debido a su naturaleza química y toxicidad estos compuestos pueden poner en peligro el suministro de alimentos, la salud y el bienestar humanos.

El empleo de los plaguicidas ha mejorado la calidad de vida de las personas, al salvar millones de vidas durante la lucha contra enfermedades infecciosas transmitidas por vectores como la malaria, la fiebre amarilla y el tifus. Además, el uso de plaguicidas en la agricultura moderna ha mejorado el rendimiento de los cultivos al controlar las plagas de interés económico (Gouma, 2009). Sin embargo, la aplicación de plaguicidas también ha generado efectos adversos a las diferentes formas

de vida y a los ecosistemas en general, lo que dependerá del grado de sensibilidad de los organismos y de los efectos tóxicos de los plaguicidas (CICOPLAFEST, 2004).

Los informes de la Organización de las Naciones Unidas estiman que, de todos los plaguicidas usados en la agricultura, entre el 1 y el 10% alcanza los cultivos y el resto termina contaminando el suelo, el aire y principalmente, el agua (Gamon et al., 2003, Shalaby y Abdou, 2010). Por lo que es de suma importancia realizar acciones de monitoreo, para detectar su presencia y persistencia ambiental, caracterización de su toxicología sobre organismos no blanco, incluido el ser humano (Arshad et al., 2016; Fernández et al., 2020) y en función de los resultados de estos estudios proponer cambios regulatorios de su uso en la legislación (Zikankuba et al., 2019; Abou-Zeid et al. 2020; Kudsk y Mathiassen, 2020) y estrategias de remediación de sus impactos ambientales (Morillo y Villaverde, 2017; Rajmohan et al., 2020).

En el contexto nacional, están autorizados para su uso agrícola y comercial formulaciones de plaguicidas que por su toxicidad y potencial contaminante han sido prohibidas en diferentes países del mundo, incluyendo insecticidas organoclorados como el endosulfán (prohibido en 79 países) y DDT (prohibido en 75 países), y organofosforados el paratión metílico (prohibido en 59 países), así como herbicidas de la familia de las triazinas como atrazina (prohibido en 35 países) (Bejarano-González, 2017). Reciente el herbicida glifosato, ingrediente activo del “Roundup” herbicida comercial más utilizado a nivel mundial, fue clasificado como potencialmente cancerígeno para los humanos por la Agencia Internacional para la investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), en México, en diciembre de 2020 se decretó la prohibición total de uso en el campo nacional para el año 2024, por lo que es de suma importancia establecer estrategias para la eliminación y restauración de los sitios contaminados por este herbicida, así como para la eliminación de los pasivos ambientales que se generaran como resultado de su prohibición en el territorio nacional.

Los daños que los diferentes plaguicidas causan al ambiente y a la salud, así como la existencia de plaguicidas obsoletos, hacen necesario el desarrollo de tecnologías que garanticen su eliminación de una manera segura, eficiente y de bajo costo. Dentro de las tecnologías existentes se encuentran los tratamientos físicos y químicos. Sin embargo, los *tratamientos biológicos* prometen ser eficientes, más económicos y seguros, debido a que se llevan a cabo mediante diferentes tipos de reacciones catalizadas por enzimas de microorganismos específicos (Ortiz-Hernández et al., 2013).

Los estudios de biorremediación se han enfocado en el aislamiento, identificación y caracterización de cepas bacterianas o consorcios capaces de degradar plaguicidas, posteriormente se han llevado a cabo estudios de genómica ambiental, los cuales se enfocaron en la caracterización de cepas a través del marcador 16S RNAr y el establecimiento de propuestas para las vías de degradación de plaguicidas (Symons y Bruce 2006). Sin embargo, este conocimiento no es suficiente para predecir el comportamiento de los organismos durante el proceso de biodegradación.

Recientemente se han desarrollado otros estudios relacionados con el proceso de biodegradación, tales como la regulación transcripcional, el comportamiento cinético y la relación estructura-función de las enzimas involucradas en el proceso (Díaz y Prieto 2000; Tropel y van der Meer 2004; de Melo Plese et al. 2005; Svedruzic' et al. 2005). Lo anterior debido a que los procesos de biodegradación son susceptibles de ser aplicados en la biorremediación de sitios contaminados. Idealmente, las estrategias de remediación deben ser diseñadas con base en el conocimiento de los microorganismos presentes en los sitios contaminados, sus habilidades metabólicas y su respuesta a las condiciones ambientales (Rodríguez et al., 2020).

Los métodos para secuenciación del ADN han hecho posible el analizar la expresión de genes bajo diferentes condiciones ambientales (transcriptoma), identificar las proteínas que son expresadas (proteómica) y caracterizar metabolitos secundarios de bajo peso molecular (metabolómica).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

Particularmente la transcripción es un paso esencial en la expresión de genes y su comprensión es de gran interés en la biología molecular y celular. La investigación en esta área es indispensable para descifrar los elementos funcionales del genoma y determinar cuando los genes son expresados y de qué forma son regulados. Entender la expresión de genes que coordina la respuesta a la biodegradación de los plaguicidas puede ayudar a identificar muchos procesos biológicos. El análisis de los cambios en la expresión de genes que acompaña a la exposición de las bacterias a los plaguicidas, ayudará a caracterizar las posibles perturbaciones en la transcripción de genes y conocer los mecanismos moleculares involucrados en la degradación de los plaguicidas (Rodríguez et al., 2020).

2. ANTECEDENTES

En el Laboratorio de Investigaciones Ambientales del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se han desarrollado diferentes trabajos relacionados con el aislamiento de cepas bacterianas de suelos agrícolas que han recibido contantes aplicaciones de plaguicidas para el control de plagas. Estas cepas se han caracterizado por su eficiencia de degradación de plaguicidas organofosforados, a través de la realización de cinéticas de crecimiento y degradación, además de establecer las condiciones ambientales a las cuales estas cepas tienen mejor actividad degradadora, tanto en sistemas de células en suspensión como inmovilizadas sobre diferentes soportes orgánicos e inorgánicos.

En particular dos cepas bacterianas Gram-negativas pertenecientes al género *Burkholderia*, *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2, han demostrado alta eficiencia en la degradación de plaguicidas organofosforados, como el paratión metílico y al 4-nitrofenol principal metabolito derivado de su degradación, compuesto químico altamente tóxico para la mayoría de los microorganismos del suelo. En condiciones de laboratorio, las cepas fueron cultivadas en medio mineral suplementado con el plaguicida paratión metílico como única fuente de carbono, como resultado de los experimentos se observó que el metabolito 4-nitrofenol aparece inmediatamente en el medio cultivo como producto de la hidrólisis del plaguicida mediada por estos microorganismos, y posteriormente comienza una disminución de su concentración hasta desaparecer totalmente, en tiempos de degradación muy cortos, menores a 12 horas, lo que indica que los aislados no sólo son capaces de hidrolizar el plaguicida sino que también utilizar el producto de la hidrólisis como fuente de carbono y energía. Aunque estas cepas son del mismo género y están muy relacionadas filogenéticamente, presentan diferencias importantes en la velocidad de degradación del paratión metílico y del 4-nitrofenol (Fernández-López *et al.*, 2017; Popoca-Ursino *et al.*, 2017). Adicionalmente, se cuenta con el genoma completo de las dos cepas (Tabla 2), lo que

ha permitido analizar los posibles genes que codifican para proteínas que catalizan las reacciones de degradación, así como estudios transcriptómicos de las cepas expuestas a paratión metílico (Castrejón-Godínez *et al.*, 2019; Ortiz-Hernández *et al.*, 2021).

Tabla 2. Datos obtenidos del ensamblado de los genomas de las cepas de *Burkholderia* sp.

Cepa	Bioproject	Longitud Total (pb)	Número de Contigs	Referencia
<i>B. zhejiangensis</i> CEIB S4-3	PRJNA264584	7,666,841	154	Hernández-Mendoza <i>et al.</i> , 2014
<i>B. cenocepacia</i> CEIB S5-2	PRJNA301637	8,976,170	109	Martínez-Ocampo <i>et al.</i> , 2016

Se ha reportado la capacidad de cepas del género *Burkholderia* en la biodegradación del glifosato tales como *Burkholderia caryophilli* (Dotson et al. 1996), *Burkholderia pseudomallei* (Norris et al. 2009), *Burkholderia multivorans* (Li et al. 2013), y recientemente *Burkholderia vietnamiensis* (Monogaran *et al.*, 2018). El glifosato se biodegrada a través de dos rutas, la vía de la sarcosina y la vía del ácido aminometilfosfónico (AMPA), la vía de la sarcosina inicia con la acción de una enzima carbón-fósforo liasa (C-P liasa), que corta directamente el enlace carbono-fósforo del glifosato para producir sarcosina, metabolito que posteriormente se degrada a glicina y formaldehído por la acción de la enzima sarcosil oxidasa, por otro lado, a través de la vía AMPA, el glifosato se degrada a AMPA y glioxilato por la acción de la enzima glifosato oxidoreductasa, dependiente de FADH⁺, que rompe el enlace C-N de la molécula, posteriormente una C-P liasa transforma a AMPA a metilamina, liberando el fósforo, o es convertida a formilfosfonato vía transaminación y finalmente el formilfosfonato se degrada a formaldehído por la acción de una fosfonatasa (Castrejón-Godínez *et al.*, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

El glifosato (GP) es un compuesto organofosforado que tiene un enlace carbono-fósforo (C-P) muy estable en su molécula. Es un ingrediente activo en diferentes formulaciones herbicidas comerciales como, Roundup, Roundup Ultra, Rodeo, Glycel, Ground Bio, o Faena en México, entre otras marcas alrededor del mundo, estos herbicidas son ampliamente utilizados en agricultura para la eliminación de malezas anuales y perennes. Desde el inicio de su comercialización (1974) al año 2014, se estima que se han utilizado alrededor de 8.9 billones de kilogramos de herbicidas basados en glifosato como principio activo, incrementando significativamente su aplicación a partir del surgimiento de los cultivos genéticamente modificados de soya y maíz tolerantes al glifosato “Roundup Ready” en la década de los 90’s, desplazando a otros herbicidas. El glifosato y los formulados herbicidas que lo contienen generan efectos adversos a diferentes niveles del ecosistema, desde los microorganismos del suelo, los insectos, los mamíferos y los seres humanos. El glifosato presenta una alta capacidad para acumularse en el suelo y causar efectos negativos efectos sobre la salud humana y el ambiente, la presencia del herbicida en suelos contaminados se ha detectado hasta dos años posteriores a su aplicación. Se ha reportado que la exposición al glifosato se relaciona con la degradación de las células hepáticas, mutaciones genéticas, y cambios estructurales a nivel de los cromosomas.

Por lo tanto, es importante desarrollar estrategias para la degradación del glifosato en el suelo mediante la biorremediación. La biodegradación de glifosato por microorganismos autóctonos o introducidos puede ser una alternativa eficaz para su eliminación de suelos y aguas contaminados. Sin embargo, los datos actualmente disponibles sobre las vías metabólicas de biodegradación de este tipo de herbicidas por microorganismos, así como las estrategias moleculares que emplean para resistir sus efectos adversos son limitados.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficiencia de degradación de glifosato en un sistema de camas biológicas para dos cepas de *Burkholderia* (*Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2), y evaluar los cambios transcripcionales y de la expresión diferenciada de proteínas en ambas cepas como respuesta a la exposición a glifosato para identificar genes y proteínas relacionados al mecanismo de degradación y respuesta al estrés químico generado por el plaguicida en la célula.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar de la capacidad de las cepas de *Burkholderia* para la biodegradación de glifosato *in vitro*.
2. Evaluar los mecanismos de biodegradación de glifosato y de respuesta a los efectos derivados de la exposición al herbicida en las cepas evaluadas a través de análisis transcriptómicos.
3. Evaluar la eficiencia de biodegradación de glifosato a través de un sistema de camas biológicas, para residuos en suelo o tratamiento de pasivos ambientales de glifosato derivados de la prohibición de su uso en México.

5. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

5.1. Glifosato

Las investigaciones del presente proyecto se realizaron utilizando la formulación comercial de glifosato conocida como FAENA® en México. Las concentraciones utilizadas fueron 100, 200, 500 y 1,000, 1,500, 2,000, 4,000 y 6,000 mg/L. Asimismo, se utilizaron concentraciones de 50, 100 y 200 mg/L del herbicida (Chem Service, West Chester, PA, USA) con una pureza mayor a 98%.

5.2. Metal pesado

En los experimentos de resistencia bacteriana a glifosato en placas de agar, se utilizó como control de inhibición y referencia de toxicidad CdSO_4 (Cd^{+2}) el cual inhibe el crecimiento de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2.

5.3. Obtención de inóculo de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2

Para la obtención de los inóculos bacterianos ambas cepas, *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2, fueron cultivadas en matraces de 125 mL con medio de cultivo caldo de soya tripticaseína (CST) durante un tiempo de 18 horas a 30°C y 120 rpm. Posteriormente, las células fueron cosechadas por centrifugación, lavadas dos veces con una solución de NaCl 0.8% (p/v), y la suspensión celular bacteriana se ajustó a una densidad óptica de 0.5 a 600 nm, esta suspensión celular fue utilizada como inóculo para las pruebas de degradación de glifosato.

5.4. Evaluación de la capacidad de crecimiento y degradación de glifosato por las cepas bacterianas

Las pruebas de crecimiento y degradación de glifosato se realizaron por triplicado, en matraces de 125 mL con 50 mL de medio de sales minerales (MMSM), con la siguiente composición en g/L: K_2HPO_4 , 0.82; KH_2PO_4 , 0.19; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.20; KNO_3 , 2.0; $(NH_4)_2SO_4$, 0.99. Por cada litro de MSM, se agregarán 2 mL de una solución de elementos traza, con la siguiente composición: H_3BO_3 , 2.8; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2.55; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.17; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 2.43; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25; pH 7.00 ± 0.05 (modificado de Yáñez-Ocampo, 2009) y suplementado con concentraciones de 100, 200, 500 y 1,000, 1,500, 2,000, 4,000 y 6,000 mg/L del herbicida comercial (FAENA, Monsanto Comercial, S. de R. L. de C.V.), y con el herbicida a una pureza superior al 98% con las concentraciones de 50, 100 y 200 mg/L, como única fuente de carbono, y utilizando como controles los cultivos bacterianos sin el herbicida. El proceso de incubación de los cultivos se realizó en 48 horas, en las mismas condiciones de temperatura y agitación utilizadas para obtención de los inóculos bacterianos, durante el desarrollo de las cinéticas de crecimiento y degradación se tomaron muestras de 2 mL cada 2 horas, durante las primeras 12 horas del cultivo y cada 12 h hasta concluir la cinética, para la medición del crecimiento a una longitud de onda de 600 nm y la determinación de la concentración glifosato remanente en el cultivo (10 muestras totales).

Para la determinación de glifosato mediante UHPLC, la muestra de cultivo fue centrifugada a 14,000 rpm para eliminar el paquete celular, el sobrenadante conteniendo el glifosato fue congelado y mantenido en almacenamiento a $-20^\circ C$, para su posterior derivatización química con el grupo Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) para permitir su determinación a través de UHPLC, utilizando una columna C18 y un detector UV-Vis a una longitud de onda de 260 nm. Este último paso metodológico no se logró realizar debido a que los compuestos requeridos para la derivatización (Fmoc) y para la detección del producto principal de degradación, ácido aminometilfosfónico

(AMPA), no han sido suministrados por el proveedor, se espera recibirlos en las próximas semanas, lo que permitirá concluir con esta fase del proyecto.

5.5. Concentración Mínima Inhibitoria en presencia de glifosato

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la concentración mínima en la se inhibe el crecimiento bacteriano en presencia de glifosato. El ensayo se realizó de la siguiente manera, se tomó una colonia aislada de cada cepa y se resembró en dos matraces con 50 mL de caldo de soya tripticaseína (CST) a 30°C a 100 rpm durante 12 horas, hasta obtener una densidad óptica de 0.5 (600 nm). Posteriormente, se tomó 1 mL de los cultivos y se mezcló con 9 mL de Agar de Soya Tripticaseína (AST) tibio, las mezclas fueron vertidas en cajas Petri, una vez gelificado el agar se agregaron 5 µL de H₂O destilada como control negativo de inhibición y diferentes concentraciones de glifosato (100 a 6000 mg/L y el compuesto a la concentración del formulado comercial). Las concentraciones fueron inoculadas en las cajas de Petri de menor a mayor en dirección a las agujas del reloj, una vez terminado fueron incubadas a 30°C por 24 horas, finalmente fueron analizadas cada una de las Cajas Petri, los diámetros de los halos de inhibición presentados en el medio se reportaron en milímetros. Adicionalmente se realizaron experimentos con CdSO₄ (Cd⁺²) utilizando las mismas concentraciones, como control positivo de inhibición y como referencia comparativa del efecto tóxico de este metal sobre las cepas bacterianas, en comparación con los efectos generados por el glifosato.

5.6. Análisis del transcriptoma de dos cepas de *Burkholderia* expuestas al herbicida glifosato

Para los análisis transcriptómicos se seleccionó la concentración de 200 mg/L del herbicida a una pureza superior al 98%, y en tres puntos de muestreo al inicio (0 horas), en la fase exponencial (8

horas) y a las 16 horas en la fase estacionaria de la cinética de crecimiento, para determinar los cambios en el perfil transcripcional de las cepas a lo largo del proceso de biodegradación del glifosato. En cada punto de muestreo se colectaron las células por centrifugación, en presencia de 400 μ L de la solución RNeasy Lysis Buffer (Ambion, Foster City, CA, USA), posteriormente se realizó la extracción de ARN total utilizando un Kit RNeasy Mini Kit de Qiagen. Las muestras que contienen el RNA total se almacenaron a -80°C para la posterior secuenciación de los transcriptomas de ambas cepas en presencia y ausencia del glifosato, a los tres tiempos de muestreo definidos, a través de la tecnología de secuenciación Illumina HiSeq (RNAseq). La secuenciación a través de RNAseq es de gran utilidad para analizar simultáneamente un gran número de transcritos en un solo ensayo y proporciona una cobertura completa de transcritos. La información de esta manera puede ser integrada e interpretada, y se constituye de gran utilidad para vislumbrar procesos biológicos y mecanismos de coexpresión. Para realizar el proceso de secuenciación de los transcriptomas se solicitó el servicio a través de la empresa GENEWIZ (South Plainfield, NJ, USA). Las muestras de ARN total se enviaron a la empresa para su secuenciación, nos encontramos en espera de los datos correspondientes, para su análisis.

Los datos transcriptómicos serán analizados bioinformáticamente, se realizará la anotación funcional de los transcriptomas con el apoyo de los genomas de ambas cepas, determinados en reportes previos por nuestro grupo de investigación. Posteriormente se identificarán los genes que presentaron expresión diferencial de acuerdo al tiempo de muestreo y condición experimental en función de los valores de FoldChange, se realizarán análisis de Categorías de Genes Ortólogos (COG), para determinar los procesos celulares más relevantes involucrados con la respuesta a la exposición a herbicida glifosato y un análisis en la enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEEG), para identificar las vías metabólicas más importantes para el proceso de respuesta a la exposición y en la biodegradación del herbicida. La expresión diferencial de los genes con mayores cambios o bien de aquellos genes que resulten interesantes para el proceso de biodegradación serán

analizados de forma individual mediante qRT-PCR, para lo que se diseñarán oligonucleótidos específicos para cada uno y analizar sus niveles de expresión en los tiempos de muestreo determinados y las diferentes condiciones experimentales.

5.7. Estrategia de biodegradación de glifosato mediante el uso de camas biológicas

Se realizó un análisis de los principales residuos agroindustriales disponibles en México y su potencial de aplicación en camas biológicas para el tratamiento de plaguicidas, en específico del glifosato, estos resultados se presentan en el documento de Tesina del estudiante I.I. Héctor Miguel Quiroz Medina de la Especialidad en Gestión Integral de Residuos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UAEM, determinándose que el residuo agroindustrial, más utilizado en las estrategia de camas biológicas es la paja de trigo, así mismo este residuo es de alta disponibilidad en México por lo que la estrategia de biodegradación de glifosato mediante el uso de camas biológicas empleará este residuo. Posteriormente se realizarán combinaciones de formulados para la biomezcla, mismo que incluirán 1) cepa bacteriana 1 DO_{600 nm}, 2) suelo o composta y 3) residuo agroindustrial de soporte (paja de trigo), se determinará el porcentaje de degradación final del herbicida en el sistema y su eficiencia de degradación con respecto al tiempo, agregando soluciones con concentraciones del herbicida de 100, 500 y 1,000 mg/L. Una vez establecidas las condiciones de operación y la biomezcla más eficiente para el sistema de cama biológica, la tecnología podrá ser transferida a los agricultores para su uso. Esta fase del proyecto se realizará en el proyecto de tesis de maestría de la estudiante Biol. Ángela Patricia Vargas Orozco del programa de Maestría en Biotecnología del Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM, que ingresó al programa de posgrado en el mes de enero de 2022.

6. RESULTADOS OBTENIDOS

6.1. Cinéticas de crecimiento de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 en caldo de soya tripticaseína

Cinéticas de crecimiento de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 se realizaron en caldo de soya tripticaseína (CST), con la finalidad de observar los tiempos de cultivo correspondientes para las diferentes fases de crecimiento de las bacterias. En la Figura 6.1 se muestra la cinética de crecimiento de la bacteria *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3, observando una fase de adaptación desde las 0 hasta la 4 horas, la cual indica que las células bacteriana se adaptan a las condiciones del medio sobre el que se ha inoculado, posteriormente la fase exponencial se presenta de las 4 a las 20 horas, en esta fase la velocidad de crecimiento (duplicación celular) es máxima y se observa un crecimiento exponencial de la población celular en el cultivo, a partir de las 20 horas inicia la fase estacionaria, que se prolonga hasta la 40 horas, esta fase corresponde a un período en el cual se agotan los nutrientes por lo que el crecimiento de los microorganismos se reduce, se liberan metabolitos secundarios y se acumulan los desechos producto del metabolismo celular y finalmente la fase de muerte se observa a partir de las 44 horas, en esta fase no se presenta crecimiento celular debido a que los nutrientes del medio se han agotado completamente y la población celular empieza a decaer.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

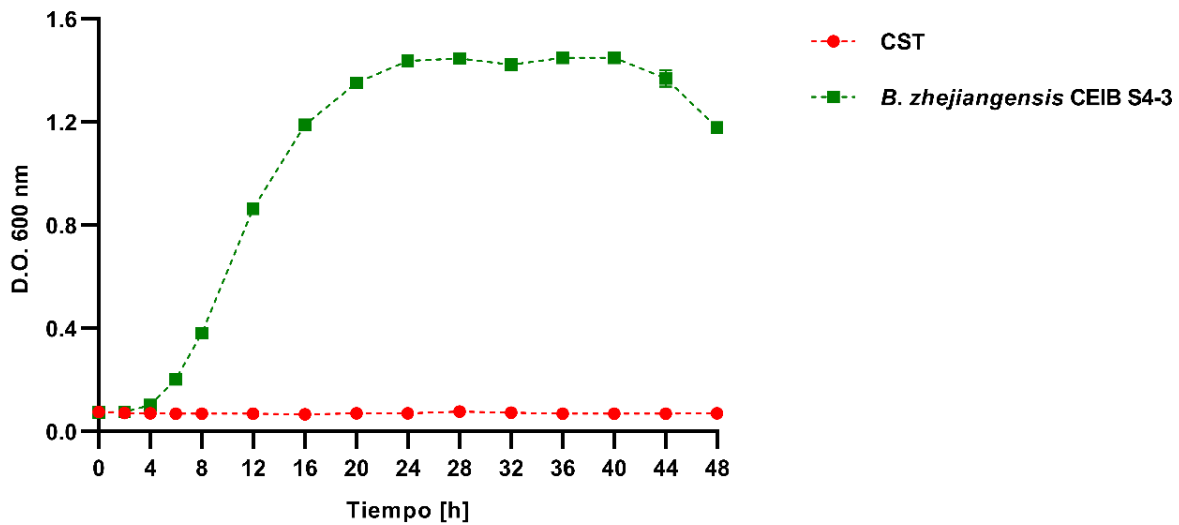


Figura 6.1. Cinética de crecimiento de *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 en medio de cultivo Caldo Soya Trypticaseína (CST).

Por otro lado, la figura 6.2 muestra la cinética de crecimiento de la cepa *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 en la cual se puede observar la fase de adaptación o latencia en un rango de tiempo de 0-4 horas, seguida de una fase exponencial en un periodo de tiempo de 6 a 16 horas, una fase estacionaria de las 20 hasta las 36 horas y finalmente la fase de muerte de las 40 a las 48 horas.

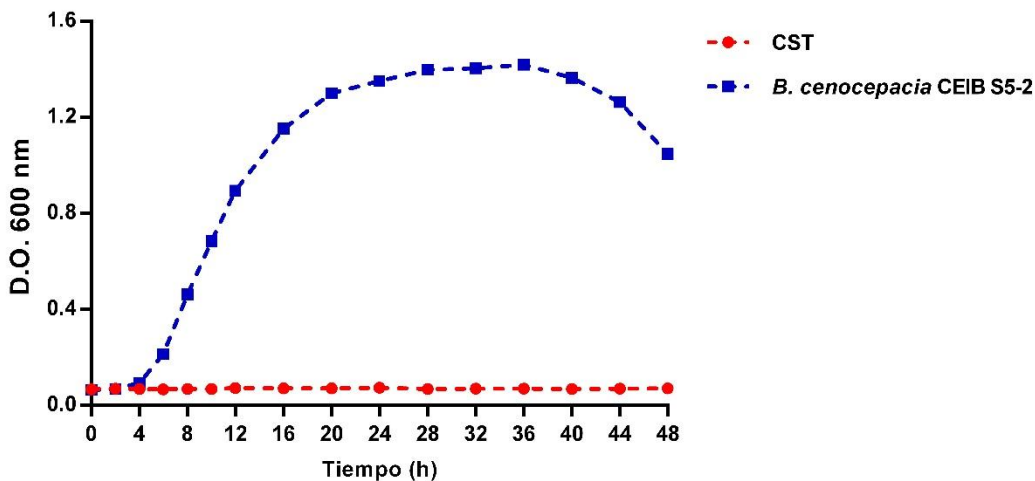


Figura 6.2. Cinética de crecimiento de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 en medio de cultivo Caldo Soya Trypticaseína (CST).

6.2. Cinéticas de crecimiento de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 en caldo de soya tripticaseína y glifosato comercial

Una vez caracterizado el crecimiento de ambas cepas en CST, se procedió a realizar las cinéticas de crecimiento en el mismo medio de cultivo, pero en presencia del glifosato comercial, con la finalidad de obtener información científica referente a los efectos de la exposición al herbicida comercial utilizado en la producción agrícola sobre el desarrollo del crecimiento bacteriano. Las concentraciones utilizadas en esta investigación fueron 100, 200, 500, 1,000, 1,500 y 2,000 mg/L. Los resultados demostraron que ambas cepas bacterianas son capaces de crecer en presencia de las diferentes concentraciones de glifosato (Figuras 6.3 y 6.4). En la cinética de crecimiento de la cepa *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 se muestra un efecto de la exposición al herbicida sobre el crecimiento, a medida que se incrementa la concentración del herbicida (100-2,000 mg/L), se observan un impacto negativo sobre el crecimiento de la cepa, la fase de adaptación se prolonga (Figura 6.3) de

4 horas en ausencia de glifosato, hasta 16 horas a la concentración de 2,000 mg/L de glifosato, así también se observa una disminución en la absorbancia máxima registrada en los cultivos expuestos, (1,000 a 2,000 mg/L), en comparación con el testigo en ausencia del herbicida.

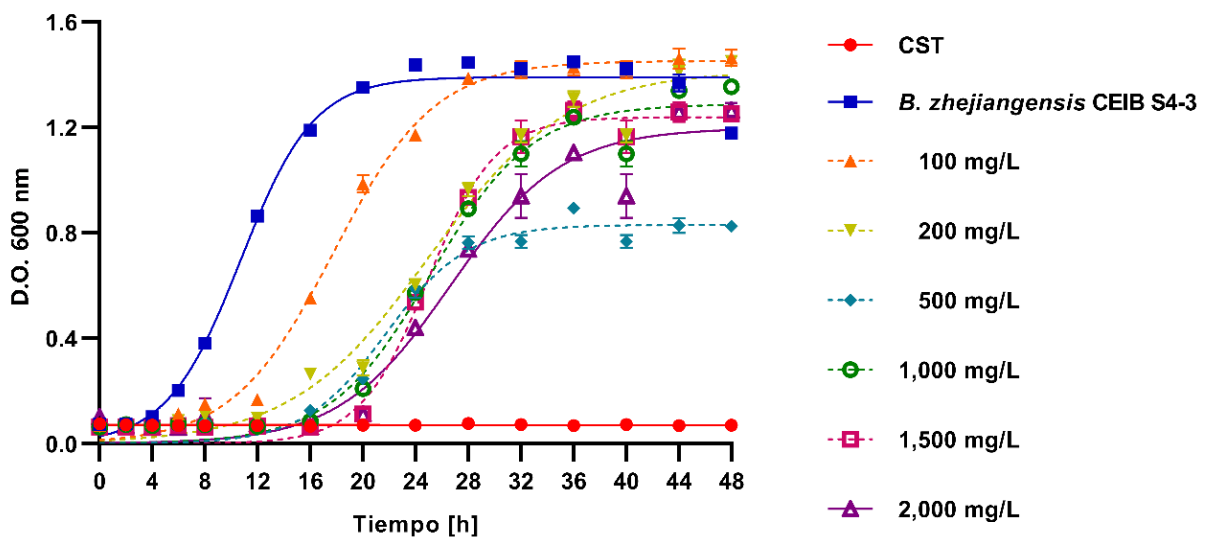


Figura 6.3. Efecto de la exposición a glifosato sobre el desarrollo del crecimiento de *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 en medio de cultivo Caldo Soya Tripticaseína (CST).

Por otro lado, la cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2 presenta mayor resistencia al herbicida, con respecto a lo observado con la cepa *B. zhejiangensis* CEIB S4-3, desde concentraciones de 100 hasta 1,500 mg/L, debido a que los cultivos no presentaron diferencias en su fase de adaptación y niveles de crecimiento. Mientras que en los experimentos en los que se utilizó la concentración de 2,000 mg/L la cepa disminuyó su crecimiento en un 15%. Por lo que, de acuerdo con estos resultados, esta concentración resulta inhibir el crecimiento de la cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2 (Figura 6.4).

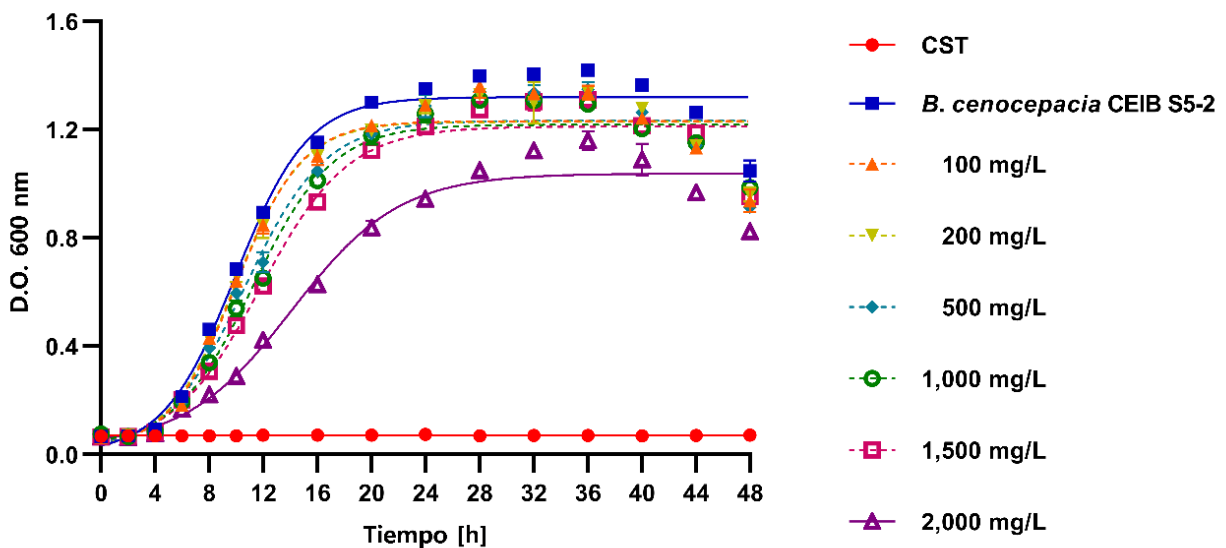


Figura 6.4. Efecto de la exposición a glifosato sobre el desarrollo del crecimiento de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 en medio de cultivo Caldo Soya Trypticaseína (CST).

6.3. Cinéticas de crecimiento de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 en MMSM y glifosato comercial

Por otra parte, las cinéticas realizadas en MMSM suplementado a diferentes concentraciones de glifosato comercial (100, 200, 500, 1,000, 1,500, 2,000, 4,000, 6,000 mg/L) demostraron nuevamente que el glifosato presenta un efecto sobre el crecimiento de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 a medida que se incrementan las concentraciones del herbicida (Figura 6.5), observando una fase de adaptación más prolongada desde las 0 hasta las 16 (100 y 200 mg/L) y de 20 a 28 horas (500 a 6,000 mg/L), lo cual sugiere que a la cepa bacteriana le toma más tiempo a adaptarse a estas condiciones. Después de estos periodos de tiempo, la cepa presenta una fase de crecimiento exponencial y una fase estacionaria hasta las 48 horas.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

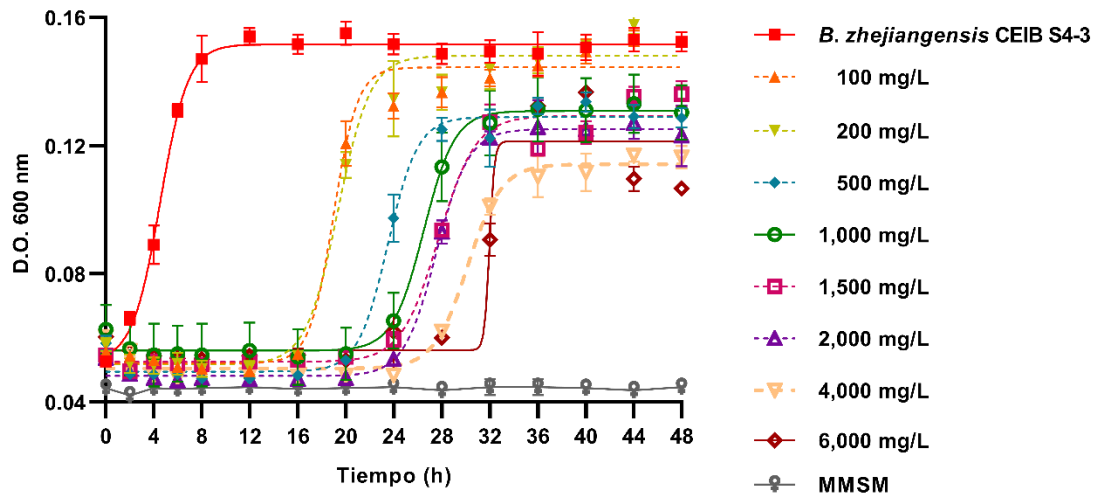


Figura 6.5. Efecto de la exposición a glifosato sobre el desarrollo del crecimiento de *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 en Medio Mínimo de Sales Minerales (MMSM).

En las cinéticas realizadas con la cepa *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 en MMSM suplementado a diferentes concentraciones de glifosato comercial (100, 200, 500, 1,000, 1,500, 2,000, 4,000, 6,000 mg/L) puede observarse que en el rango de concentraciones de 100 a 2,000 mg/L o se observa un efecto adverso sobre el crecimiento de la cepa relacionado con la exposición a la formulación comercial de glifosato, sin embargo, la exposición en altas concentraciones (4,000 y 6,000 mg/L) genera una disminución significativa en el crecimiento de la cepa (Figura 6.6).

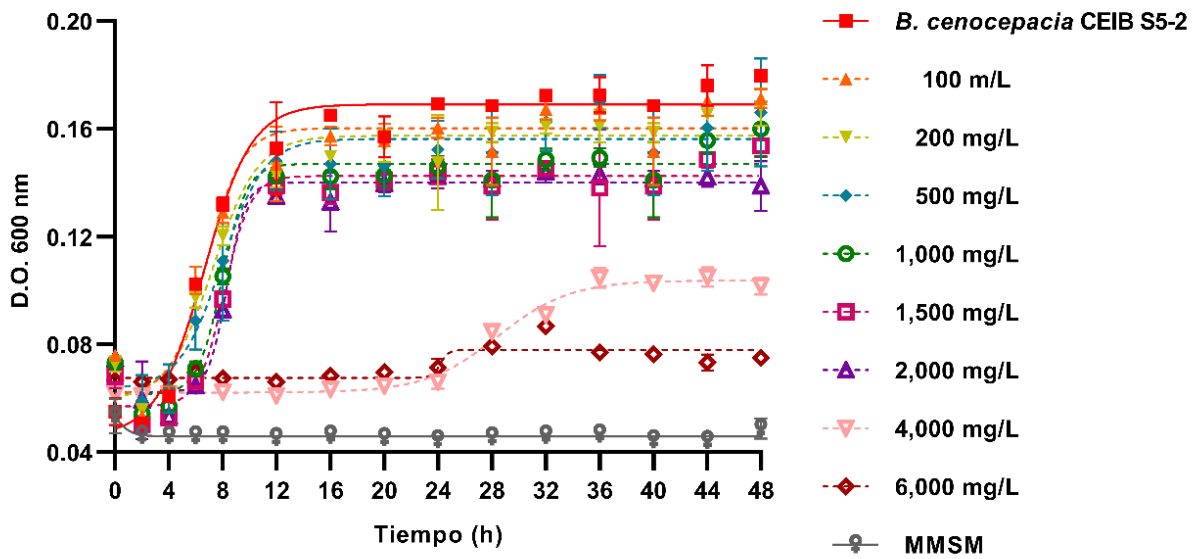


Figura 6.6. Efecto de la exposición a glifosato sobre el desarrollo del crecimiento de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 en Medio Mínimo de Sales Minerales (MMSM).

6.4. Cinéticas de crecimiento de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 en MMSM y glifosato comercial

Asimismo, se realizaron varias cinéticas de crecimiento en MMSM suplementado a diferentes concentraciones de glifosato comercial (100, 200, 500, 1,000, 1,500, 2,000, 4,000, 6,000 mg/L), pero con un inóculo inicial de 0.5 (600 nm), estos experimentos se realizaron con una mayor cantidad de inóculo con la finalidad de obtener suficiente material biológico para la extracción de RNA para los análisis transcriptómicos. Asimismo, se colocaron como control las cepas en CST, con la finalidad de comparar el crecimiento en medio rico y medio mínimo. En las figuras 6.7 se observa que *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 tiene un efecto en el crecimiento de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 a medida que se incrementan las concentraciones del herbicida, pero manteniendo un crecimiento entre 0.9 y 1.0 (600 nm). Para el caso de *Burkholderia cenocepacia*



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

CEIB S5-2 se observa en la figura 6.8 que en cualquier concentración la cepa mantiene su crecimiento entre 0.7-0.8 (600 nm). Lo cual permite sugerir que las cepas resisten a cualquier concentración de glifosato comercial.

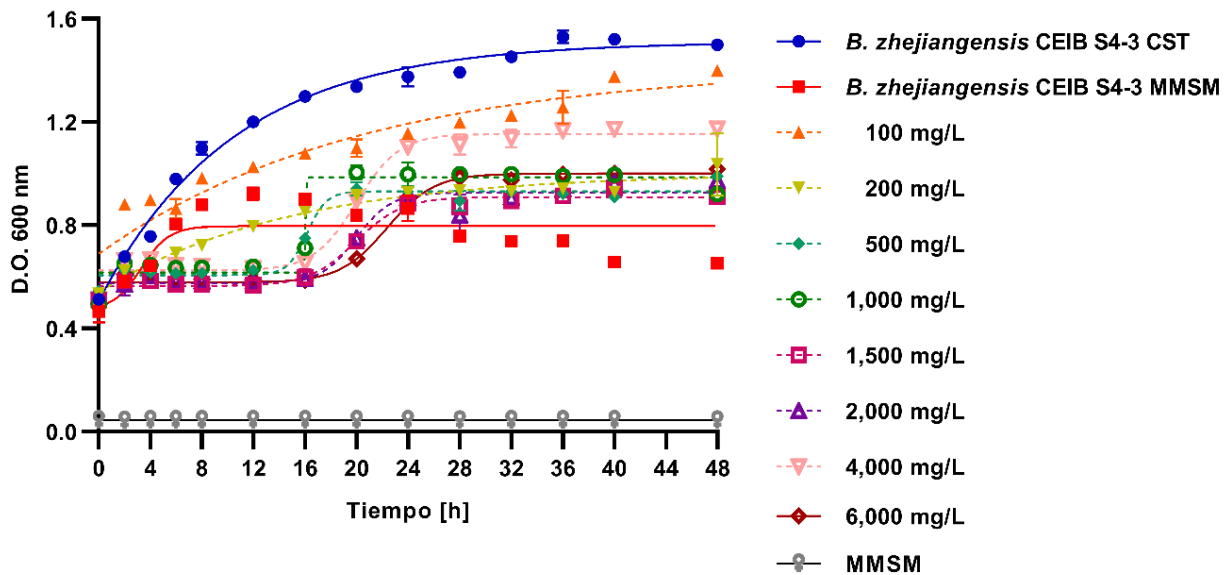


Figura 6.7. Cinéticas de crecimiento de *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 en Medio Mínimo de Sales Minerales (MMSM), para los experimentos de secuenciación de transcriptomas.

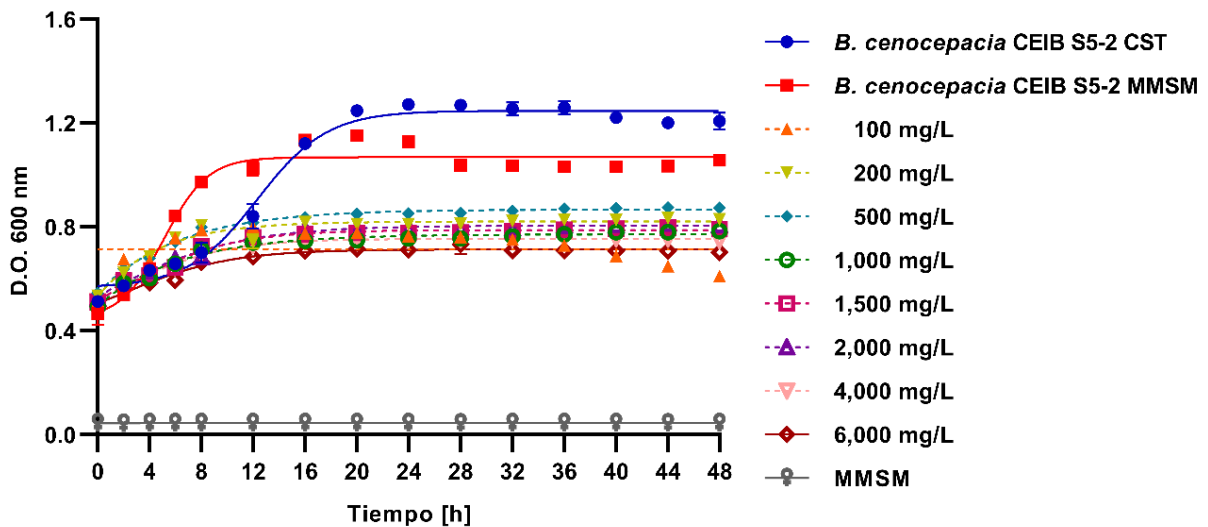


Figura 6.8. Cinéticas de crecimiento de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 en Medio Mínimo de Sales Minerales (MMSM), para los experimentos de secuenciación de transcriptomas.

6.5. Cinéticas de crecimiento de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 en MMSM y glifosato grado analítico

Se realizaron cinéticas de crecimiento con las dos cepas bacterianas en MMSM, utilizando como fuente de carbono el herbicida grado analítico (98% de pureza) a tres concentraciones (50, 100 y 200 mg/L). La figura 6.9 muestra el efecto del herbicida sobre la cepa *B. zhejiangensis* CEIB S4-3. La concentración de 50 mg/L del herbicida no causó efectos adversos sobre el desarrollo del crecimiento bacteriano de la cepa, mientras que en las concentraciones de 100 y 200 mg/L se observó un aumento en la duración de la fase de adaptación, pasando de 2 horas en MMSM y 50 mg/L de glifosato, a 16 horas en el caso de 100 y 200 mg/L, lo que indica que a la cepa bacteriana no se adapta inmediatamente a la presencia del herbicida en el cultivo, posteriormente la DO_{600nm}



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

del crecimiento bacteriano en concentraciones de 200 mg/L del herbicida, igualó al observado en MMSM suplementado con 50 mg/L de glifosato.

Por otro lado, *B. cenocepacia* CEIB S5-2 muestra que en cualquiera de las tres concentraciones probadas el crecimiento de la bacteria se triplica, pasando de una DO_{600nm} de 0.05 a 0.20, asimismo, se muestra una fase de adaptación de 2 horas, seguida de una fase exponencial de 2 a 8 horas y una fase estacionaria prolongada de 12 a 48 horas (Figura 6.10).

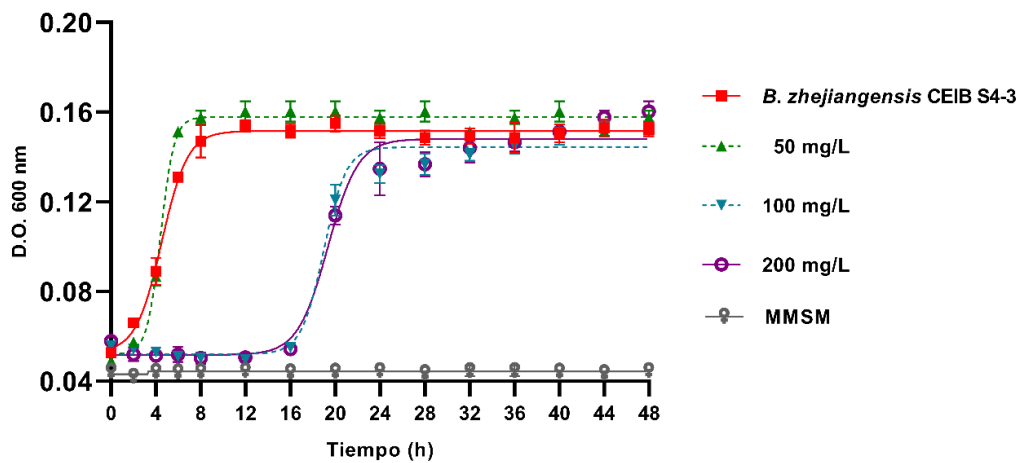


Figura 6.9. Efecto de la exposición a glifosato grado analítico sobre el desarrollo del crecimiento de *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 en Medio Mínimo de Sales Minerales (MMSM).

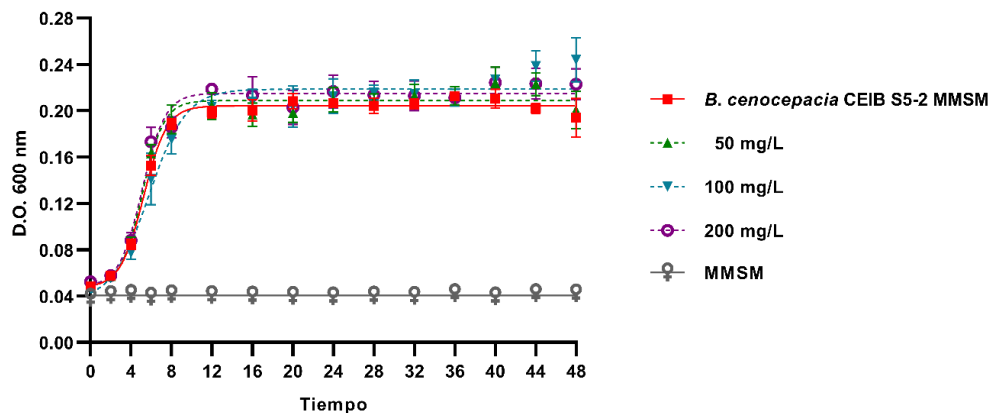


Figura 6.10. Efecto de la exposición a glifosato grado analítico sobre el desarrollo del crecimiento de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 en Medio Mínimo de Sales Minerales (MMSM).

6.6. Evaluación de la resistencia a glifosato por *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2

Asimismo, se realizó la evaluación de resistencia a glifosato comercial (FAENA®, Monsanto Comercial, S. de R. L. de C.V.) de ambas cepas bacterianas a través de la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en medio sólido, utilizando las concentraciones de (100, 200, 500, 1,500, 2,000, 4,000 y 6,000 mg/L), y utilizando como control positivo de inhibición el CdSO₄. En la figura 6.11A se muestra un efecto de inhibición del Cd sobre el crecimiento de la cepa *B. zhejiangensis* CEIB S4-3, presentando halos de inhibición de 9 a 27 mm desde la concentración de 100 hasta 6,000 mg/L. Por otro lado, en la figura 6.11B se puede observar una mínima inhibición del herbicida sobre la cepa bacteriana, comparada con una concentración equivalente de Cd. En la tabla 2 se muestran los diámetros de halos de inhibición (mm) en las diferentes concentraciones probadas. Estos resultados sugieren que *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 es capaz de tolerar al herbicida glifosato en un sistema en medio sólido, revelando su potencial para ser utilizada como una posible herramienta para la degradación de este plaguicida en suelos contaminados.

Tabla 1. Ensayos de resistencia a glifosato comercial por *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3.

Concentración de Glifosato o Cd (mg/L)	Diámetro de inhibición en mm Glifosato (mg/L)	Diámetro de inhibición en mm Cd (mg/L)
100	NP	9
200	NP	12
500	8	14
1000	8	14
1,500	12	15
2,000	8	19
4,000	15	25
6,000	16	27

NP= No presento halos de inhibición.

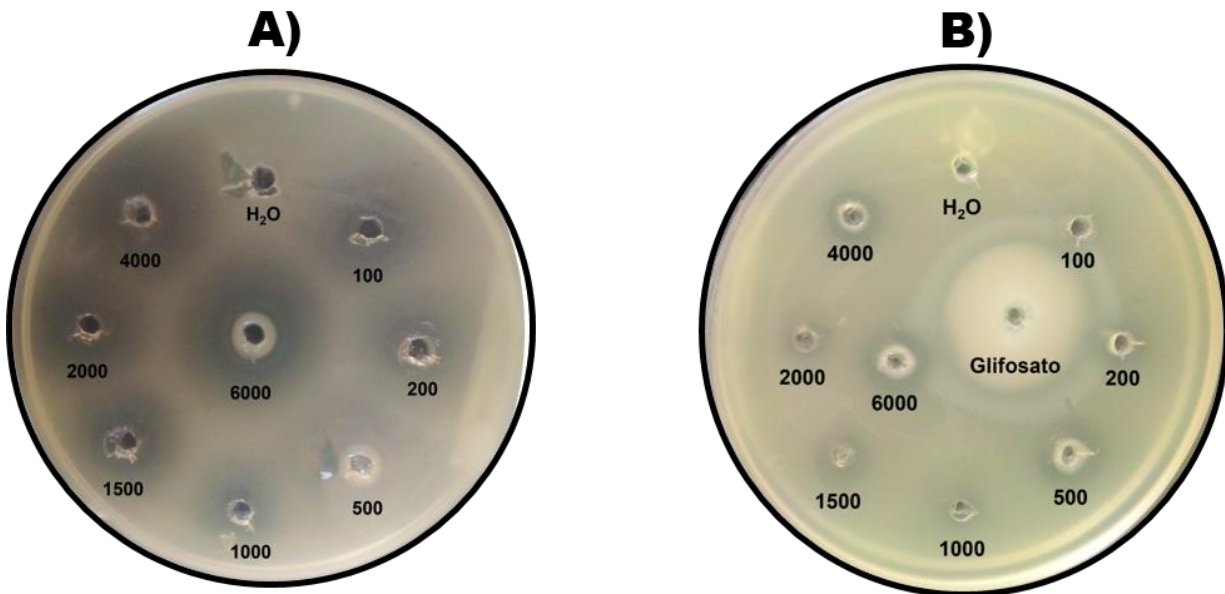


Figura 6.11. Evaluación de la tolerancia a glifosato por *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano en medio sólido (TSA). A) Control positivo de imbibición y referencia de inhibición con $CdSO_4$. B) Efecto de la exposición al herbicida glifosato comercial (FAENA, Monsanto Comercial, S. de R. L. de C.V.) a diferentes concentraciones.

Los resultados mostrados en la figura 6.12A muestran el ensayo en placa con Cd, en cual se puede observar un efecto de inhibición a través de la presencia de halos de diferentes diámetros que van de 7 a 58 mm en relación al incremento gradual de concentración (100 a 6,000 mg/L). Asimismo, los resultados muestran que la cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2 es capaz de tolerar y crecer en presencia de glifosato en cualquiera de las concentraciones antes mencionadas, inclusive se probó el herbicida comercial sin diluir, el cual se encuentra a una concentración de 363,000 mg/L (Figura 6.12B, Glifosato) revelando un halo de inhibición de aproximadamente 18 mm. Los ensayos en placa demuestran que la cepa es capaz de resistir y posiblemente contender con altas concentraciones de glifosato. En la tabla 2 se muestran los diámetros de halos de inhibición en mm en las diferentes concentraciones probadas.

Tabla 2. Ensayos de resistencia a glifosato comercial por *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2.

Concentración de Glifosato o Cd (mg/L)	Diámetro de inhibición en mm Glifosato (mg/L)	Diámetro de inhibición en mm Cd (mg/L)
100	NP	7
200	NP	12
500	NP	14
1000	NP	18
1,500	NP	21
2,000	NP	24
4,000	NP	34
6,000	NP	58

NP= No presento halos de inhibición.

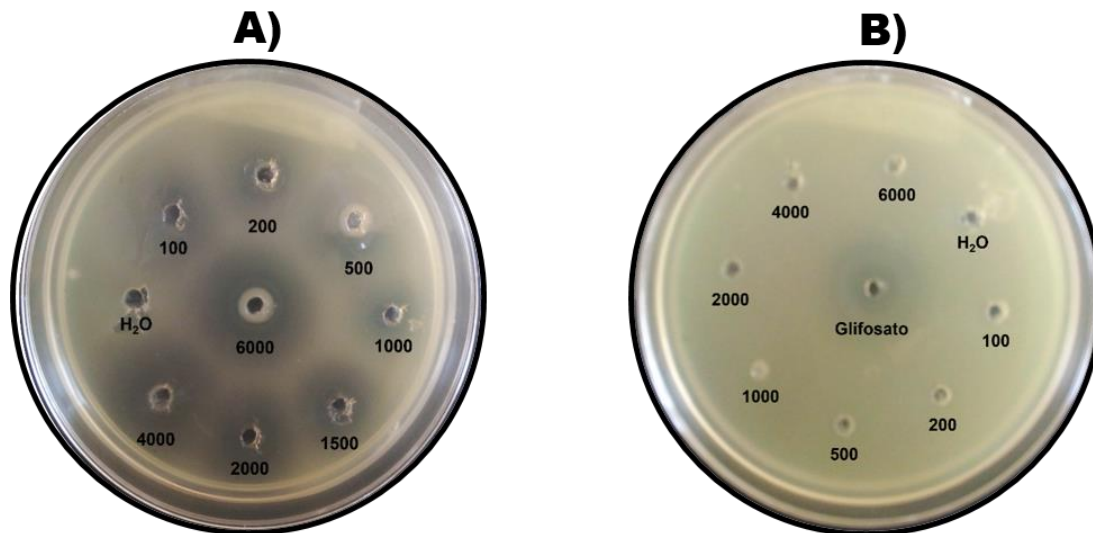


Figura 6.12. Evaluación de la tolerancia a glifosato por *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 en ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano en medio sólido (TSA). A) Control positivo de imbibición y referencia de inhibición con CdSO₄. B) Efecto de la exposición al herbicida glifosato comercial (FAENA, Monsanto Comercial, S. de R. L. de C.V.) a diferentes concentraciones.

6.7. Evaluación de la capacidad de degradación de glifosato por *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2

Durante el desarrollo de las cinéticas de crecimiento de ambas cepas con el herbicida grado analítico, se tomaron 2 mL de cada matraz experimental cada 2 horas durante las primeras 12 horas, posteriormente se colectaron las muestras cada 12 horas, para la determinación de la concentración de glifosato remanente en el medio de cultivo. Cabe señalar que las muestras se encuentran almacenadas a -20°C y listas para ser derivatizadas e inyectadas en el UHPLC, equipo que también se encuentra instalado en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales del CEIB de la UAEM. Se realizó la estandarización del proceso de derivatización química del glifosato y el ácido aminometilfosfónico (AMPA) con cloruro de 9-fluorenilmetoxicarbonilo, con los reactivos

disponibles en el laboratorio. Sin embargo, no se logró realizar la derivatización química del herbicida y su producto de hidrólisis (AMPA) presentes en las muestras obtenidas de las cinéticas de degradación, debido a que los proveedores todavía no han suministrado los reactivos correspondientes y necesarios para el desarrollo de este paso del proyecto. La requisición institucional de los productos solicitados: Cloruro de 9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMOC-Cl), pureza $\geq 99.0\%$ (HPLC), Marca Sigma y ácido aminometilfosfónico (AMPA), pureza 99.5%, Chem Service, fue ingresada en la última semana de septiembre y la factura correspondiente fue liquidada en la primera semana de noviembre y se está en espera de que en las próximas semanas sean suministrados para concluir con los análisis correspondientes y reportar los porcentajes de degradación correspondientes.

6.8. Análisis del transcriptoma de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 expuestas a glifosato

Para los análisis transcriptómicos se seleccionó la concentración de 200 mg/L del herbicida grado analítico, obteniendo 36 muestras en total de ambas cepas bacterianas, las muestras fueron colectadas por triplicado, al inicio del experimento (0 horas), cuando las cepas se colocaron en presencia y ausencia del herbicida; a las ocho horas cuando las cepas se encuentran en fase exponencial en presencia y ausencia del herbicida y a las 16 horas cuando las cepas se encuentran en fase estacionaria en presencia y ausencia del herbicida (Tabla 3).

Tabla 3. Muestras colectadas para el análisis transcriptómico.

Tiempo (Horas)	En presencia del herbicida		En ausencia del herbicida	
	<i>Burkholderia</i> <i>zhejiangensis</i> CEIB S4-3	<i>Burkholderia</i> <i>cenoecepacia</i> CEIB S5-2	<i>Burkholderia</i> <i>zhejiangensis</i> CEIB S4-3	<i>Burkholderia</i> <i>cenoecepacia</i> CEIB S5- 2
0	3	3	3	3
8	3	3	3	3
16	3	3	3	3
Total	36			

Las 36 muestras obtenidas fueron centrifugadas para colectar las células, en presencia de 400 μ L de la solución RNeasy Lysis Buffer (Ambion, Foster City, CA, USA), posteriormente se realizó la extracción de RNA total utilizando el Kit RNeasy Mini Kit de Qiagen. Posteriormente, las muestras se limpiaron y concentraron utilizando unas columnas denominadas “RNA Clean and Concentrator TM” (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Las muestras de RNA fueron analizadas por “RNA ScreenTape” de Agilent, obteniendo un número de Integridad de RNA (RIN) de ~9.0. En las figuras 6.13 y 6.14 se muestran en el primer carril el marcador de peso de 6 kb y las 18 muestras de la cepa *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 y de la *B. cenoecepacia* CEIB S5-2 respectivamente. Posteriormente, las muestras de RNA total fueron enviadas a la empresa GENEWIZ (South Plainfield, NJ, USA), para la secuenciación de los transcriptomas, a través de la tecnología de secuenciación Illumina HiSeq (RNAseq). La empresa realizará el envío de los resultados de las secuenciaciones en un periodo de 30-45 días hábiles por lo espera que en las próximas semanas envíen los resultados, para realizar su análisis correspondiente.

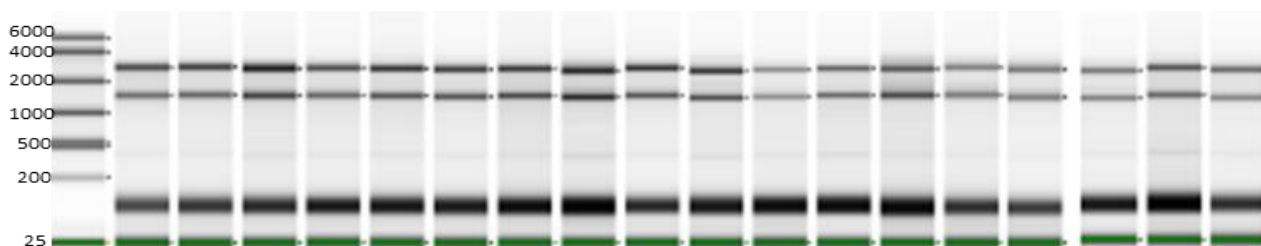


Figura 6.13. RNA de *B. zhejiangensis* CEIB S4-3. carril 1=Marcador de peso de 6 kb, carriles 1-3 con glifosato, 4-6 sin glifosato tiempo 0 horas, del carril 7-9 con glifosato, 10-12 sin glifosato del tiempo 8 horas y del carril 13-15 con glifosato y del 16-18 sin glifosato del tiempo 16 horas.

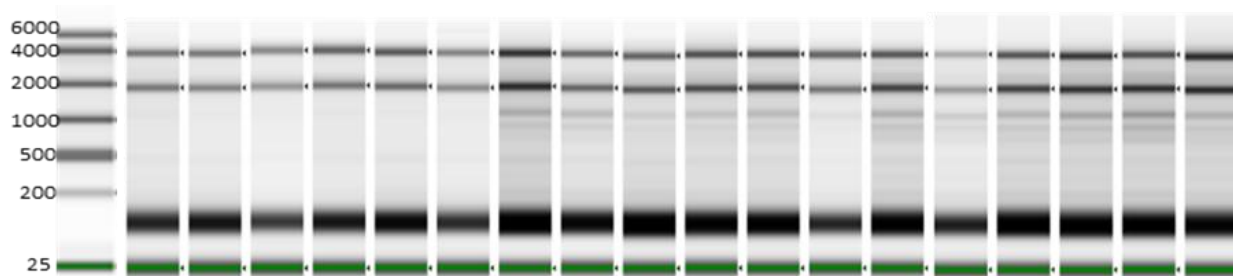


Figura 6.14. RNA de *B. cenocepacia* CEIB S5-2. carril 1=Marcador de peso de 6 kb, carriles 1-3 con glifosato, 4-6 sin glifosato tiempo 0 horas, del carril 7-9 con glifosato, 10-12 sin glifosato del tiempo 8 horas y del carril 13-15 con glifosato y del 16-18 sin glifosato del tiempo 16 horas.

Asimismo, ya se realizó el primer análisis bioinformático con los genomas de ambas cepas bacterianas. Se obtuvieron como resultados, identificar la presencia de genes que codifican para enzimas similares a glifosato oxidoreductasa, y la C-P liasa, principales enzimas relacionadas con el proceso de biodegradación del glifosato. Estos resultados son de gran importancia, debido a la presencia de estos genes ambas cepas tienen amplias posibilidades de biodegradar al herbicida. Se continuará con el análisis bioinformático de los genomas para identificar otros genes relacionados con la ruta metabólica de biodegradación de glifosato en ambas cepas bacterianas.

6.9. Estrategia de biodegradación de glifosato mediante el uso de camas biológicas

Para poder plantear esta estrategia de biodegradación de glifosato a través de camas biológicas, se planteó la tesina titulada *“Aprovechamiento de residuos agroindustriales en la generación de biobeds para disminuir la contaminación puntual por plaguicidas”*, del estudiante Ing. Héctor Miguel Quiroz Medina de la Especialidad en Gestión Integral de Residuos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UAEM, la ya ha sido concluida en tiempo y forma. En este trabajo se encontró que el residuo agroindustrial más utilizado en las estrategias de camas biológicas es la paja de trigo, así mismo este residuo es de alta disponibilidad en México por lo que la estrategia de biodegradación de glifosato mediante el uso de camas biológicas empleará este residuo. Se anexa la tesina concluida como evidencia del trabajo desarrollado.

Por otro lado, en enero de este año 2022 ingreso al programa de Maestría en Biotecnología del Centro de Investigación en biotecnología de la UAEM, la estudiante Biól. Ángela Patricia Vargas Orozco, la cual desarrollará la tesis denominada *“Evaluación de la biodegradación de plaguicidas organofosforados a través de un sistema de camas biológicas”*. En el proyecto la estudiante evaluará formulados para la biomezcla, mismo que incluirán 1) cepa bacteriana 1 DO_{600 nm}, 2) suelo o composta y 3) residuo agroindustrial de soporte (paja de trigo), se determinará el porcentaje de degradación final del herbicida en el sistema y su eficiencia de degradación con respecto al tiempo, agregando soluciones con concentraciones del herbicida de 100, 500 y 1,000 mg/L. Una vez establecidas las condiciones de operación y la biomezcla más eficiente para el sistema de cama biológica, la tecnología podrá ser transferida a los agricultores para su utilización en campos agrícolas.

7. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el proyecto de investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Tanto la cepa *B. zhejiangensis* S4-3 como *B. cenocepacia* CEIB S5-2 son capaces de resistir la exposición a la formulación comercial (FAENA®) del herbicida glifosato en concentraciones de 100 hasta 6,000 mg/L.
2. La cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2 presentó mayor tolerancia a la exposición de la formulación comercial (FAENA®) del herbicida glifosato, con respecto a la cepa bacteriana *B. zhejiangensis* S4-3.
3. Ambas cepas presentaron alta tolerancia la formulación comercial (FAENA®) del herbicida glifosato en los ensayos de CMI en placa de agar, lo que revela el potencial de estas cepas bacterianas para poder ser utilizadas como estrategia de degradación del herbicida en suelos contaminados
4. En los ensayos con el herbicida grado analítico (pureza >98%), la exposición a 50, 100 y 200 mg/L no generó efectos adversos sobre la cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2, sin embargo, en el caso de la cepa *B. zhejiangensis* S4-3 concentraciones de 100 y 200 mg/L retardaron considerablemente su crecimiento.
5. De acuerdo con los datos generados al momento la cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2 presenta mayor potencial para la degradación del herbicida glifosato (formulación comercial y reactivo de alta pureza) en sistemas *in vitro*, tanto en solución como sólidos.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

6. Finalmente, de acuerdo a todos los resultados experimentales generados en el presente proyecto podemos concluir que la cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2 fue resistente y es capaz de degradar el herbicida glifosato por lo que presenta potencial para ser utilizada en estrategias de biorremediación de suelos contaminados y el tratamiento de residuos de este plaguicida.

8. CUMPLIMIENTO DE LOS PRODUCTOS COMPROMETIDOS EN EL PROYECTO

En las siguientes tablas se desglosan los productos comprometidos por objetivo específico y los resultados obtenidos:

Objetivo específico	Meta	Producto(s)/Entregable(s)	Porcentaje de avance	Justificación
1) Determinar de la capacidad de las cepas de <i>Burkholderia</i> para la biodegradación de glifosato <i>in vitro</i> .	En la etapa se plantea la siguiente meta: Evaluar la capacidad de biodegradación de glifosato de las cepas bacterianas del género <i>Burkholderia</i> <i>in vitro</i> y a través de un sistema de camas biológicas, así como determinar los cambios transcripcionales en las bacterias expuestas al herbicida, como estrategia para el tratamiento de sus residuos sólidos y líquidos generados en el campo mexicano y como requerimiento previo para proponer estrategias de biorremediación de sitios impactados por el glifosato.	1.1) Datos experimentales de la capacidad de biodegradación <i>in vitro</i> de glifosato para ambas cepas bacterianas.	50%	Se cuenta con las muestras listas para su derivatización, se espera que en las próximas semanas el proveedor suministre los reactivos correspondientes para derivatizar e inyectar en el UHPLC para concluir con este paso del proyecto.
		1.2) Avances de una tesis de Licenciatura en Biología.	100%	Se incorporó en febrero de 2022 un estudiante de licenciatura para desarrollar su tesis. Se anexa la propuesta de tesis que será sometida a la Facultad de Ciencias Biológicas para el registro de tesis correspondiente. El estudiante se encuentra realizando la escritura de su protocolo de tesis.
		1.3) Manuscrito de un artículo de revisión referente a la biorremediación de glifosato.	100%	Se publicó el 10 de noviembre de 2021 el artículo de revisión "Glyphosate Pollution Treatment and Microbial Degradation Alternatives, a Review". Se anexa el artículo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

Objetivo específico	Meta	Producto(s)/Entregable(s)	Porcentaje de avance	Justificación
2) Evaluar los mecanismos de biodegradación de glifosato los efectos de la exposición a glifosato sobre las cepas evaluadas por transcriptómica.	En la etapa se plantea la siguiente meta: Evaluar la capacidad de biodegradación de glifosato de las cepas bacterianas del género Burkholderia in vitro y a través de un sistema de camas biológicas, así como determinar los cambios transcripcionales en las bacterias expuestas al herbicida, como estrategia para el tratamiento de sus residuos sólidos y líquidos generados en el campo mexicano y como requerimiento previo para proponer estrategias de biorremediación de sitios impactados por el glifosato.	2.1) Extracción de ARN total para los tiempos y condiciones experimentales establecidas, envío para el secuenciamiento de los transcriptomas.	100%	Se realizó la extracción de RNA de las 36 muestras de ambas cepas bacterianas y se enviaron a la empresa de GENEWIZ para su secuenciación.
		2.2) Avances de una tesis de Maestría en Biotecnología.	100%	Se integró en enero de 2022 la Biól. Ángela Patricia Vargas Orozco del programa de Maestría en Biotecnología para desarrollar su tesis. Se anexa el formato de registro de la tesis, así como sus sinodales propuestos para su evaluación y la constancia de asignación como director de la estudiante.
		2.3) Avances de una tesis de Doctorado en Ciencias Naturales.	100%	Se integró al proyecto el M. en B. José Antonio Díaz Soto, se anexa el avance de su tesis Doctoral y constancia de asignación como director del estudiante.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

Objetivo específico	Meta	Producto(s)/Entregable(s)	Porcentaje de avance	Justificación
3) Evaluar la eficiencia de biodegradación de glifosato a través de un sistema de camas biológicas, para residuos en suelo o tratamiento de pasivos ambientales de glifosato derivados de la prohibición de su uso en México.	En la etapa se plantea la siguiente meta: Evaluar la capacidad de biodegradación de glifosato de las cepas bacterianas del género Burkholderia in vitro y a través de un sistema de camas biológicas, así como determinar los cambios transcripcionales en las bacterias expuestas al herbicida, como estrategia para el tratamiento de sus residuos sólidos y líquidos generados en el campo mexicano y como requerimiento previo para proponer estrategias de biorremediación de sitios impactados por el glifosato.	3.1) Revisión sistemática de la disponibilidad de residuos agroindustriales en México y su aplicación en estrategias de camas biológicas para el tratamiento de plaguicidas.	100%	Se realizó una revisión sistemática de los residuos agroindustriales. Se anexa la tesina del estudiante I. Héctor Miguel Quiroz Medina.
		3.2) Datos experimentales sobre el proceso de biodegradación de glifosato en camas biológicas.	50%	Se integró la Biól. Ángela Patricia Vargas Orozco del programa de Maestría en Biotecnología para desarrollar. Se anexa el formato de registro de la tesis, así como sus sinodales propuestos para su evaluación y la constancia de asignación como director de la estudiante.
		3.3) Avances de una tesis de Licenciatura en Biología.	100%	Solo se incorporó un estudiante de la Licenciatura en Biología. Se anexa la propuesta de tesis que será sometida a la Facultad de Ciencias Biológicas para el registro de tesis correspondiente. El estudiante se encuentra realizando la escritura de su protocolo de tesis.
		3.4) Avances de una tesina de especialidad en Gestión Integral de Residuos.	100%	El estudiante I.I. Héctor Miguel Quiroz Medina de la Especialidad en Gestión Integral de Residuos, concluyo su tesina y se encuentra en proceso de titulación, presentará su examen de grado en el mes próximo. Se anexa la tesina concluida del estudiante.
		3.4) Manuscrito de un artículo de revisión referente a la aplicación de camas biológicas para el tratamiento de residuos de plaguicidas.	100%	Se escribió un capítulo de libro para la editorial Springer, se anexa el manuscrito del capítulo. Asimismo, se está escribiendo un artículo de revisión basado en los datos obtenidos en la tesina del estudiante I.I. Héctor Miguel Quiroz Medina.
INFORME FINAL		4) Informe técnico final de la etapa	100%	Se anexa informe en extenso (Anexo 5).

FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

Para el desarrollo del proyecto se integraron los siguientes estudiantes:

Grado	Nombre del estudiante	Nombre de la tesis o tesina
Licenciatura	Abrajan Rivera Jesús Eduardo	Evaluación de la degradación de glifosato a través de cepas bacterianas aisladas de ambientes contaminados con plaguicidas organofosforados.
Especialidad	I.I. Héctor Miguel Quiroz Medina	Aprovechamiento de residuos agroindustriales en la generación de biobeds para disminuir la contaminación puntual por plaguicidas.
Maestría	Biól. Ángela Patricia Vargas Orozco	Evaluación de la biodegradación de glifosato a través de un sistema de camas biológicas.
Doctorado	M. en B. José Antonio Díaz Soto	Respuesta transcripcional de <i>Burkholderia cenocepacia</i> CEIB S5-2 en la degradación de glifosato.

PRODUCTOS ADICIONALES AL PROYECTO

PARTICIPACIÓN EN SIMPOSIO

Adicionalmente a los productos comprometidos, se presentó el siguiente trabajo en un simposio.

1. Díaz-Soto José Antonio, Castrejón-Godínez María Luisa, Mussali-Galante Patricia. Tovar-Sánchez Efraín, Rodríguez Solís Alexis Joavany. Ponente en modalidad cartel con el trabajo titulado: Evaluación de la resistencia a glifosato en cepas bacterianas del género *Burkholderia*, en el 5° Simposio del Cuerpo Académico Ecotoxicología: de las moléculas a los ecosistemas, celebrado de manera virtual el 04 de noviembre de 2021 en Cuernavaca, Morelos, México.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou Zeid, M. I., Jammoul, A. M., Melki, K. C., Abou Jawdah, Y., & Awad, M. K. (2020). Suggested policy and legislation reforms to reduce deleterious effect of pesticides in Lebanon. *Heliyon*, 6(12), e05524.
- Arshad, M., Siddiqa, M., Rashid, S., Hashmi, I., Awan, M. A., & Ali, M. A. (2016). Biomonitoring of toxic effects of pesticides in occupationally exposed individuals. *Safety and health at work*, 7(2), 156-160.
- Bejarano-González (2017). Los plaguicidas altamente peligrosos en México. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México, A. C. (RAPAM).
- Bonner, M. R., & Alavanja, M. C. R. (2017). Pesticides, human health, and food security. *Food Energy Secur* 6 (3): 89–93.
- Brusseau, M. L., & Artiola, J. F. (2019). In Brusseau, M. L., Pepper, I. L. and Gerba, C. P. (Eds). Chemical contaminants. In *Environmental and pollution science*, Third Edition. Academic Press. pp. 175-190. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814719-1.00012-4>
- Castrejón-Godínez, M. L., Ortiz-Hernández, M. L., Salazar, E., Encarnación, S., Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Sánchez-Salina, E. & Rodríguez, A. (2019). Transcriptional analysis reveals the metabolic state of *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 during methyl parathion degradation. *PeerJ*, 7, e6822.
- Castrejón-Godínez, M. L., Tovar-Sánchez, E., Valencia-Cuevas, L., Rosas-Ramírez, M. E., Rodríguez, A., & Mussali-Galante, P. (2021). Glyphosate Pollution Treatment and Microbial Degradation Alternatives, a Review. *Microorganisms*, 9(11), 2322.
- CICOPLAFEST (2004). Catálogo Oficial de Plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control de Proceso y Uso de plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. SAGARPA, SEDESOL, Méx., D. F. 481 pp.
- Damalas C. A. (2009). Understanding benefits and risks of pesticide use. *Scientific Research and*

Essay. 4(10), 945-949.

- de Melo Plese L.P., Paraiba L.C., Foloni L.L., Pimentel Trevizan L.R. (2005). Kinetics of carbosulfan hydrolysis to carbofuran and the subsequent degradation of this last compound in irrigated rice fields. *Chemosphere* 60(2):149–156.
- Diaz E., Prieto M.A. (2000). Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr Opin Biotechnol* 11(5):467–475.
- Dotson, S. B., Smith, C. E., Ling, C. S., Barry, G. F., & Kishore, G. M. (1996). Identification, characterization, and cloning of a phosphonate monoester hydrolase from *Burkholderia caryophylli* PG2982. *Journal of Biological Chemistry*, 271(42), 25754-25761.
- Engindeniz, S. (2008). Economic analysis of agrochemical use for weed control in field-grown celery: a case study for Turkey. *Crop protection*, 27(3-5), 377-384.
- FAO (2002). Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Adoptado por el 123° Período de Sesiones del Consejo de la FAO. Roma, pp 31.
- FAO, OMS (2015) Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Adoptado por el 123° Período de Sesiones del Consejo de la FAO. Roma
- Fernández, S. F., Pardo, O., Corpas-Burgos, F., & Yusà, V. (2020). Exposure and cumulative risk assessment to non-persistent pesticides in Spanish children using biomonitoring. *Science of The Total Environment*, 746, 140983.
- Fernández-López, M. G., Popoca-Ursino, C., Sánchez-Salinas, E., Tinoco-Valencia, R., Folch-Mallol, J. L., Dantán-González, E., & Laura Ortiz-Hernández, M. (2017). Enhancing methyl parathion degradation by the immobilization of *Burkholderia* sp. isolated from agricultural soils. *MicrobiologyOpen*, 6(5), e00507.
- Gamon M., E Saenz E., Gil J. and Boluda R. (2003). Direct and indirect exogenous contamination by pesticides of rice-farming soils in a Mediterranean wetland. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 141–151.
- Gouma S. (2009). Biodegradation of mixtures of pesticides by bacteria and white rot fungi. Ph.d.

- Thesis. School of Health Cranfield University. 416 p.
- Hernández-Mendoza, A., Martínez-Ocampo, F., Beltrán, L. F. L. A., Popoca-Ursino, E. C., Ortiz-Hernández, L., Sánchez-Salinas, E., & Dantán-González, E. (2014). Draft genome sequence of the organophosphorus compound-degrading *Burkholderia zhejiangensis* strain CEIB S4-3. *Genome announcements*, 2(6), e01323–14.
- Kudsk, P., & Mathiassen, S. K. (2020). Pesticide regulation in the European Union and the glyphosate controversy. *Weed Science*, 68(3), 214-222.
- Li, G. X., Wu, X. Q., & Ye, J. R. (2013). Biosafety and colonization of *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 and its growth-promoting effects on poplars. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(24), 10489-10498.
- Manogaran, M., Ahmad, S. A., Yasid, N. A., Yakasai, H. M., & Shukor, M. Y. (2018). Characterisation of the simultaneous molybdenum reduction and glyphosate degradation by *Burkholderia vietnamiensis* AQ5-12 and *Burkholderia* sp. AQ5-13. *3 Biotech*, 8(2), 1-8.
- Martínez-Ocampo, F., López, M. G. F., Beltrán, L. F. L. A., Popoca-Ursino, E. C., Ortiz-Hernández, M. L., Sánchez-Salinas, E., Ramos-Quintana, F., Villalobos-López, M.A. & Dantán-González, E. (2016). Draft genome sequence of *Burkholderia cenocepacia* strain CEIB S5-2, a methyl parathion-and p-Nitrophenol-degrading bacterium, isolated from agricultural soils in Morelos, Mexico. *Genome announcements*, 4(2), e00220-16
- Morillo, E., & Villaverde, J. (2017). Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 586, 576-597.
- Norris, M. H., Kang, Y., Lu, D., Wilcox, B. A., & Hoang, T. T. (2009). Glyphosate resistance as a novel select-agent-compliant, non-antibiotic-selectable marker in chromosomal mutagenesis of the essential genes *asd* and *dapB* of *Burkholderia pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6062-6075.
- Ortiz-Hernández M. L, Sánchez-Salinas E., Dantán-González E. y Popoca-Ursino E.C. (2013). Mechanisms and strategies for pesticide biodegradation: opportunity for waste, soils and

- water cleaning. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29 (Número especial sobre plaguicidas) 85-104.
- Ortiz-Hernández, M.L., Gama-Martínez, Y., Fernández-López, M., Castrejón-Godínez, M.L., Encarnación, S., Tovar-Sánchez, E., Salazar, E., Rodríguez, A. & Mussali-Galante, P. (2021). Transcriptomic analysis of *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 during methyl parathion degradation. *Environmental Science and Pollution Research*. Published *on line*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13647-6>
- Popoca-Ursino, E. C., Martínez-Ocampo, F., Dantán-González, E., Sánchez-Salinas, E., & Ortiz-Hernández, M. L. (2017). Characterization of methyl parathion degradation by a *Burkholderia zhejiangensis* strain, CEIB S4-3, isolated from agricultural soils. *Biodegradation*, 28(5), 351-367.
- Rajmohan, K. S., Chandrasekaran, R., & Varjani, S. (2020). A review on occurrence of pesticides in environment and current technologies for their remediation and management. *Indian Journal of Microbiology*, 60(2), 125-138.
- Rodríguez, A., Castrejón-Godínez, M. L., Salazar-Bustamante, E., Gama-Martínez, Y., Sánchez-Salinas, E., Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E. & Ortiz-Hernández, M. (2020). Omics approaches to pesticide biodegradation. *Current Microbiology*, 77(4), 545-563.
- Shalaby Sh. E.M., Abdou G. Y. (2010). The influence of soil microorganisms and bio- or -organic fertilizers on dissipation of some pesticides in soil and potato tube. *Journal of Plant Protection Research*. 50 (1). 86-92.
- Sheahan, M., Barrett, C. B., & Goldvale, C. (2017). Human health and pesticide use in sub-Saharan Africa. *Agricultural Economics*, 48(S1), 27-41.
- Shukla K.P., Nand Kumar Singh N. K. and Sharma S. (2010). Biochemical and molecular basis of pesticides degradation by microorganisms. *Cri. Rev. Biotcnol.* 19,197-225.
- Svedruzic´ D., Jo´nsson S., Toyota C.G., Reinhardt L.A., Ricagno S., Lindqvist Y., Richards N.G. (2005). The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 433(1):176–192.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

- Symons Z.C., Bruce N.C. (2006). Bacterial pathways for degradation of nitroaromatics. *Nat Prod Rep* 23(6):845–850.
- Tropel D., van der Meer J.R. (2004). Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(3):474–500.
- Yañez-Ocampo, G., Sanchez-Salinas, E., Jimenez-Tobon, G. A., Penninckx, M., & Ortiz-Hernández, M. L. (2009). Removal of two organophosphate pesticides by a bacterial consortium immobilized in alginate or tezontle. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2-3), 1554-1561.
- Zikankuba, V. L., Mwanyika, G., Ntwenya, J. E., & James, A. (2019). Pesticide regulations and their malpractice implications on food and environment safety. *Cogent Food & Agriculture*, 5(1), 1601544.