

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



ANEXO 3. RESUMEN EJECUTIVO

Introducción: Las actividades humanas han generado diferentes impactos negativos en todos los niveles de organización biológica, entre ellos la liberación al aire, al agua y al suelo de una gran cantidad de materiales y sustancias contaminantes. Entre estos contaminantes se encuentran los plaguicidas, sustancia o mezcla de sustancias que se utilizan para controlar diferentes tipos plagas. En la agricultura moderna utiliza ampliamente 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. Sin embargo, la aplicación de plaguicidas también ha generado efectos adversos a las diferentes formas de vida y a los ecosistemas.

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 y organofosforados. 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 métodos biológicos prometen ser eficientes, más económicos y seguros, debido a que los microorganismos, como las bacterias llevan a cabo reacciones catalizadas por enzimas en diferentes plaguicidas, teniendo la capacidad de degradarlos. Los estudios de biorremediación se han enfocado en el aislamiento, identificación y caracterización de cepas bacterianas o consorcios capaces de degradar plaguicidas. Sin embargo, este conocimiento no es suficiente para predecir el comportamiento de los organismos durante el proceso de biodegradación. Por lo que estudios transcriptómicos permiten analizar la expresión de genes bajo diferentes condiciones ambientales, para descifrar los elementos funcionales del genoma y determinar cuando los genes son expresados y de qué forma son regulados.

Antecedentes: En el Laboratorio de Investigaciones Ambientales del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se cuenta las cepas *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2, las cuales han demostrado alta eficiencia en la degradación del plaguicida paratión metílico y su metabolito resultante 4-nitrofenol en un tiempo menor a 12 horas. Diferentes bacterias del género *Burkholderia* han sido reportadas por su capacidad para degradar al herbicida glifosato. El glifosato es un plaguicida organofosforado 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.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

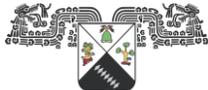


Por lo tanto, es importante desarrollar estrategias para la degradación del glifosato en el suelo mediante la biorremediación. La biodegradación de glifosato por bacterias puede ser una alternativa eficaz para su eliminación de suelos y aguas contaminados. Sin embargo, los datos actualmente disponibles sobre las vías metabólicas de biodegradación de este tipo de herbicida por microorganismos, así como las estrategias moleculares que emplean para resistir sus efectos adversos son limitados. Por lo cual, los datos generados en este proyecto son relevantes para abordar información sobre los mecanismos transcripcionales que emplean las bacterias para combatir con este herbicida.

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.

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 y 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.

Principales Resultados: Se realizaron cinéticas de crecimiento de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 en caldo de soya tripticaseína (CST), lo cual permitió caracterizar las fases de crecimiento de ambas cepas. Posteriormente, se realizaron cinéticas de crecimiento de ambas cepas en CST suplementado con glifosato comercial a diferentes concentraciones 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. Por otro lado, las cinéticas realizadas en medio mínimo de sales minerales (MMSM) y glifosato comercial a concentraciones de 100, 200, 500, 1,000, 1,500, 2,000, 4,000 y 6,000 mg/L, demostraron que a medida que se va incrementando la concentración de glifosato se presenta un efecto sobre el crecimiento de ambas cepas bacterianas, pero teniendo más efecto en *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3, estas mismas condiciones experimentales fueron repetidas pero con un inóculo inicial de 0.5 (600 nm), lo cual permite sugerir que las cepas resisten a cualquier concentración de glifosato comercial. Finalmente, otras cinéticas fueron realizadas en MMSM, pero con glifosato grado analítico (98% de pureza), a 0.5 de inóculo inicial y a concentraciones de 50, 100 y 200 mg/L, los resultados en *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 muestran que la concentración de 50 mg/L no causó efectos adversos sobre su crecimiento, mientras que en las concentraciones de 100 y 200 mg/L se observó una fase de adaptación más prolongada. Por otro lado, las cinéticas de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 mostraron que en cualquiera de las tres concentraciones probadas el crecimiento de la bacteria se triplica.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Con respecto a la evaluación de resistencia a glifosato comercial de ambas cepas bacterianas a través de la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en medio sólido, se observó en *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 halos de inhibición desde la concentración de 100 hasta 6,000 mg/L en presencia de Cd, sin embargo, cuando se encuentra presente el glifosato a estas mismas concentraciones, se observa una mínima inhibición del herbicida sobre la cepa bacteriana. Por otro lado, los resultados de *B. cenocepacia* CEIB S5-2, demostraron la presencia de halos de inhibición en presencia de Cd, sin embargo cuando es expuesta a glifosato no se presentan halos de inhibición. Estos resultados sugieren que ambas cepas bacterianas son capaces de tolerar al glifosato en medio sólido, revelando su potencial para ser utilizada como una posible herramienta para la degradación de este plaguicida en suelos contaminados.

Con respecto a la evaluación de la capacidad de degradación de glifosato por *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 de las cinéticas de crecimiento de ambas cepas con el herbicida grado analítico, las muestras fueron colectadas y almacenadas a -20°C , se encuentran listas para ser derivatizadas e inyectadas en el UHPLC, 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.

Para los análisis transcriptómicos se colectaron 36 muestras de las cinéticas con glifosato grado analítico en MMSM a las 0, 8 y 16 horas, se realizó la extracción de RNA, obteniendo en promedio un número de Integridad de RNA (RIN) de ~ 9.0 . Las muestras de RNA total fueron enviadas a la empresa GENEWIZ 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.

Por último, para poder plantear esta estrategia de biodegradación de glifosato a través de camas biológicas, se desarrolló 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. En este trabajo se encontró que el residuo agroindustrial más utilizado en las estrategias de camas biológicas es la paja de trigo. Por otro lado, en enero de 2022 ingreso a la Maestría en Biotecnología la estudiante 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*”.

Aplicación del conocimiento: Los plaguicidas son compuestos indispensables en la producción de alimentos, sin embargo, se han convertido en contaminantes importantes ya sea cuando se encuentran en forma de residuos o cuando han ingresado al ambiente en sitios específicos, como el suelo y agua causando efectos adversos sobre la biota circundante y la salud humana, uno de los plaguicidas catalogado como contaminante ambiental es el glifosato, herbicida ampliamente utilizado a nivel



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



mundial para el control de malezas y que debido a su uso intensivo, persistencia y acumulación en los suelos agrícolas, aunado a su potencial como agente carcinogénico, ha sido prohibido en diferentes países y la prohibición total de su uso en la agricultura en México será en 2024. Derivado de su prohibición es de gran relevancia establecer estrategias que permitan remediar los sitios impactados por este herbicida y proponer alternativas para el tratamiento de los residuos y de los pasivos ambientales en los que se convertirán los lotes de glifosato producidos y que no podrán aplicarse en la agricultura.

Las estructuras químicas de los plaguicidas como el glifosato son susceptibles a la degradación microbiana, por lo que las estrategias biológicas de remediación de sitios contaminados con plaguicidas aprovechan el potencial metabólico de los microorganismos para biodegradar estos compuestos, por lo que es de gran relevancia entender las vías metabólicas mediante las cuales se lleva a cabo este proceso de degradación biológica. En los últimos años han surgido nuevas herramientas para elucidar los mecanismos por los cuales la degradación de plaguicidas se lleva a cabo, estas nuevas herramientas incluyen a la transcriptómica, que pueden ayudar a entender los mecanismos incluidos en la regulación del proceso de mineralización a detalle, así como los cambios fisiológicos bajo condiciones ambientales específicas y a predecir el metabolismo de algún contaminante (como los plaguicidas) por las cepas aquí estudiadas. Esta información permitirá comprender mejor los procesos de degradación, incrementar la eficiencia de eliminación de residuos de glifosato y la biorremediación de sitios contaminados por glifosato. Así como, diseñar un sistema de cama biológica implementado estas cepas bacterianas para la biodegradación de residuos de glifosato.

El desarrollo de este proyecto permitió generar conocimiento básico de frontera respecto a los procesos de degradación bacteria del herbicida glifosato, así como las estrategias celulares relacionadas con la resistencia a los efectos adversos de la exposición al glifosato y las vías metabólicas implicadas en su biodegradación. Por otro lado, con esta información y mediante ensayos permitirá el establecimiento de una estrategia sencilla y de fácil aplicación en el contexto agrícola mexicano para el tratamiento de agua contaminada con el herbicida, así como proponer una estrategia la biodegradación del herbicida glifosato y para la biorremediación de ambientes contaminados con este compuesto químico, mediante el empleo de cepas bacterianas aisladas de suelos agrícolas. El diseño de la estrategia se basa en el empleo de un sistema de cama biológica, en la que la biomezcla que permite la biodegradación del plaguicida. El tamaño del sistema a emplear y la composición de la biomezcla se estandarizará para generar un prototipo de cama biológica efectivo para la biodegradación de glifosato que pueda ser transferido a través de cursos y talleres a los productores agrícolas nacionales. Una vez establecidos los parámetros para la eficiencia del sistema se iniciará con su promoción con los usuarios objetivo.

Fortalezas del grupo de trabajo: El grupo de trabajo que desarrollo el presente proyecto se conformó por cuatro investigadores, todos con el grado de Doctor y pertenecientes al Sistema Nacional de Investigadores, que colaboran en la realización de investigación conjunta en el ámbito de las Ciencias Ambientales, en específico el tratamiento biológico de compuestos xenobióticos y la remediación de sitios contaminados:



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



- Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos
- Dra. Patricia Mussali Galante, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos
- Dr. Efraín Tovar Sánchez, Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos
- Dra. María Luisa Castrejón Godínez, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos

La combinación de sus diferentes líneas de investigación ha permitido establecer colaboraciones estratégicas en el ámbito de la caracterización de sitios contaminados con contaminantes orgánicos e inorgánicos, evaluación de la toxicidad ambiental y sobre la salud humana de los contaminantes y proponer estrategias de remediación ambiental.

Conclusiones: 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. Asimismo, ambas cepas presentaron alta tolerancia a la formulación comercial (FAENA®) del herbicida glifosato en los ensayos de CMI. 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*.