



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

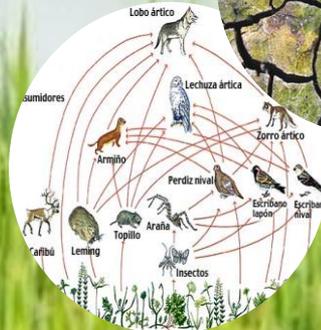
**DR. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLÍS
PROFESOR INVESTIGADOR DE TIEMPO COMPLETO
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

Glifosato

Métodos de transformación



Biológico



Contaminación de Suelo, Aire, Agua

Ingreso a las cadenas tróficas, efectos adversos sobre los ecosistemas y la salud

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.
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.

METODOLOGÍA

Cinéticas de crecimiento de *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 y *B. cenocepacia* S5-2

CST

MMSM

MMSM + Glifosato comercial

MMSM + Glifosato grado analítico

Investigación sobre residuos agroindustriales

Muestras colectadas para derivatización y análisis UHPLC

Análisis transcriptómicos

Cepas bacterianas

Suelo o composta

Paja de trigo

Glifosato

Extracción de RNA

Camas biológicas

Transcritos



Secuenciación Illumina HiSeq

Anotación funcional (COG y KEGG)

Aplicación en suelos agrícolas
Agricultores del Estado de Morelos

RESULTADOS

1. Las cinéticas de crecimiento de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 en caldo de soya tripticaseína permitieron caracterizar las fases de crecimiento de ambas cepas.
2. Las cinéticas de crecimiento de ambas cepas en caldo de soya Tripticaseína pero en presencia de glifosato comercial a diferentes concentraciones 100, 200, 500, 1,000, 1,500 y 2,000 mg/L, demostraron que ambas cepas bacterianas son capaces de crecer en presencia de las diferentes concentraciones de glifosato.
3. Las cinéticas realizadas en 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.
4. Las cinéticas realizadas en MMSM y glifosato comercial a concentraciones de 100, 200, 500, 1,000, 1,500, 2,000, 4,000 y 6,000 mg/L pero con un inóculo inicial de 0.5 (600 nm) permite sugerir que las cepas resisten a cualquier concentración de glifosato comercial.
5. Las cinéticas realizadas en MMSM y 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 alargada. 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.
6. 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.
7. Muestras colectadas para la evaluación de la capacidad de degradación de glifosato por ambas cepas y almacenadas a -20°C, para ser derivatizadas e inyectadas en UHPLC.
8. Colecta de 36 muestras de las de las cinéticas con glifosato grado analítico en MMSM a las 0, 8 y 16 horas, se realizó la extracción de RNA y fueron enviadas a la empresa de GENEWIZ para la secuenciación del transcriptoma, a través de la tecnología de secuenciación Illumina HiSeq (RNAseq).
9. Se encontró que el residuo agroindustrial más utilizado en las estrategias de camas biológicas es la paja de trigo Esta investigación fue desarrollada por el estudiante Héctor Miguel Quiroz Medina de la Especialidad en Gestión Integral de Residuos en la tesina titulada “Aprovechamiento de residuos agroindustriales en la generación de biobeds para disminuir la contaminación puntual por plaguicidas”, el cual será utilizado en las camas biológicas.

CONCLUSIONES

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