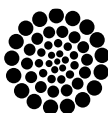




GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Desarrollo de protocolo para la degradación de glifosato en suelos y agua empleando microorganismos y enzimas con capacidades ligninolíticas inmovilizados en diversos soportes

Colaboradores

Dra. María de los Angeles Calixto Romo (ECOSUR, Tapachula)

(Responsable técnico)

Dra. Lorena Amaya Delgado (CIATEJ, Zapopan, Jalisco)

Dra. María Eugenia Hidalgo Lara (CINVESTAV, Zacatenco, CDMX)

Dra. Dulce María Infante Mata (ECOSUR, Tapachula, Chiapas)

Dra. Irene Sánchez Moreno (ECOSUR, San Cristobal de las casas, Chiapas)

Dr. Arturo Torres Dosal (ECOSUR, San Cristobal de las casas, Chiapas)

Personal que participó en la obtención de resultados

Dra. Rosbi Cruz Ornelas

M. en C. Obed Aguilar Najarro

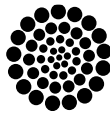
Dr. Guillermo Flores Cosío

M. en C. José Ángel García

M. en C. Dulce Thelma González Castillo

Resumen:

El Soconusco, Chiapas es una zona dedicada predominantemente a actividades agrícolas y por las características geográficas es una zona con humedad superior al 70%. Esta condición ambiental favorece el desarrollo de una amplia biodiversidad en especies vegetales, propiciando que en las zonas destinadas al cultivo abunde la maleza, mas que en cualquier otra zona agrícola del País, problema que es minimizado con el uso desmedido de herbicidas como el glifosato, mas conocido mundialmente por su marca comercial "Round up". Esto ha provocado la contaminación de suelos y cuerpos de agua del Soconusco, Chiapas como lo reportan Ruiz-Toledo et al 2014, quienes encontraron este herbicida en zonas de cultivo, en pozos de aguas particulares y en áreas protegidas.



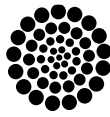
Con la finalidad de mitigar el impacto negativo ocasionado por el uso desmedido del glifosato y para atender la convocatoria de "Desarrollo de innovaciones tecnológicas para una agricultura mexicana libre de agro-insumos tóxicos" se elaboró la presente propuesta que trató del desarrollo de protocolos para la degradación de glifosato en suelos y cuerpos de agua empleando microorganismos y enzimas inmovilizados en diversos soportes. El objetivo de esta convocatoria estuvo enfocado a la mitigación del impacto ambiental que durante años ha contaminado nuestros suelos y cuerpos de agua, por lo que, se requieren soluciones que puedan ser escalables y puedan ser aplicadas en un corto, mediano y largo plazo en volúmenes grandes de agua, así como también para su aplicación en suelos, por estos motivos, se utilizaron diversos soportes de inmovilización con características deseables para su futuro escalamiento.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El Soconusco, Chiapas es una zona dedicada predominantemente a actividades agrícolas y por las características geográficas es una zona con humedad superior al 70%, existen dos épocas del año, la de lluvias que comprende del mes de mayo hasta finales de noviembre y alcanza mas de 90% de humedad ambiental, el resto del año es periodo de estiaje con una humedad promedio del 70%. Ésto provoca una amplia biodiversidad en microbiota y sobretodo en especies vegetales, provocando que las zonas destinadas al cultivo se invadan con facilidad de maleza. Este problema es atenuado con el uso desmedido de herbicidas como el glifosato, mas conocido mundialmente por su marca comercial "Round up". Esto ha provocado la contaminación de suelos y cuerpos de agua como lo reportan Ruiz-Toledo et al 2014, quienes encontraron este herbicida en zonas de cultivo, en pozos de aguas particulares y en áreas protegidas del Soconusco, Chiapas.

Con la finalidad de mitigar el impacto negativo ocasionado por el uso desmedido del glifosato se elaboró la presente propuesta que trató del desarrollo de protocolos para la degradación de glifosato en suelos y cuerpos de agua mediante sistemas inmovilizados de microorganismos y enzimas.

Algunos de los integrantes de la presente propuesta se dedican a la búsqueda de enzimas que degradan la materia vegetal, principalmente en glicosilhidrolasas y enzimas ligninolíticas. Estas últimas son ampliamente usadas en procesos de biorremediación de suelos y aguas para eliminar contaminantes como: derrames de petróleo, colorantes, pesticidas en nuestra institución y parte de los integrantes de esta propuesta han utilizado sistemas enzimáticos ligninolíticos para la degradación de contaminantes emergentes como los fármacos: metamizol, naproxeno, ketoprofeno, diclofenaco, el herbicida altamente tóxico paraquat, entre otros (Aguilar-Najarro 2021; Cruz-Ornelas et al. 2019, Cruz-Ornelas 2019-B; Camacho Moralez et al 2017; Mayorga et al 2017; Camacho et al 2017-B).



Por otro lado, está reportado que las enzimas ligninolíticas así como también los hongos productores de este tipo de enzimas se han empleado para la degradación de glifosato (Pizzul et al 2009; Eman et al 2013, Klimek et al 2001).

Por estos motivos, hemos hecho una selección de los microorganismos ligninolíticos que se han aislado en nuestro grupo de trabajo de los cuales ya se tienen estudios de las condiciones necesarias para la producción de enzimas ligninolíticas y evaluar sus capacidades de degradación del glifosato en suelos y aguas contaminadas del Soconusco, Chiapas.

Como primer etapa de la propuesta se caracterizaron aguas y suelos de las zonas contaminadas con glifosato. Por otro lado, se analizaron cuál de los hongos filamentosos ligninolíticos fue capaz de remover glifosato, estos hongos han sido aislados de diversos ambientes. Además, provienen de residuos agroindustriales de la caña de azúcar, del tequila y del café.

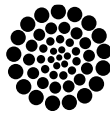
Como parte de la segunda y tercer etapa se obtendrán los sistemas inmovilizados utilizando los extractos enzimáticos completos del microorganismo seleccionado para inmovilizarlos en soportes inertes tipo zeolitas. Los soportes de inmovilización que se emplearán en la presente propuesta tienen la característica de ser escalables, esto favorecerá su uso en sistemas a mayor escala para la biorremediación de aguas contaminadas con glifosato. Los hongos inmovilizados fueron evaluados para la biorremediación de cuerpos de agua, pero preferentemente para la biorremediación de los suelos contaminados con el herbicida el soporte en el que se inmovilizaron fue poliuretano.

Los suelos y aguas contaminados se colectaron de las zonas de cultivo donde se aplica el glifosato.

JUSTIFICACIÓN.

Basándonos en los estudios previos de detección de glifosato reportados en el Soconusco, Chiapas, así como también, aprovechando que en el grupo de trabajo cuenta con reportes previos de la producción de enzimas ligninolíticas que degradan contaminantes emergentes y otro tipo de herbicidas empleados en las zonas de referencia. Encontramos la oportunidad de llevar a cabo la aplicación de los biocatalizadores que hemos caracterizado previamente y realizar estudios de biorremediación de suelos y aguas contaminados con glifosato.

Debido a la naturaleza de la convocatoria se buscó que los estudios aquí realizados fueran fácilmente escalables permitiendo que el estudio preliminar pueda aplicarse en un mediano y largo plazo para volúmenes mayores de aguas contaminadas con glifosato así como también en extensiones grandes de suelos, con recuperación de los soportes a emplear para tener una mejor gestión de los



residuos sólidos que puedan generarse con la presente propuesta.

La implementación de esta tecnología a nivel laboratorio permitió evaluar el potencial de degradación de glifosato. Los resultados obtenidos fueron positivos por lo que podrán ser desarrollados en futuros estudios en los cuales se realice la optimización de los sistemas para que estos sean aplicados a una mayor escala en un mediano o largo plazo.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de esta convocatoria esta enfocado a la mitigación del impacto ambiental de suelos y cuerpos de agua que el glifosato ha contaminado durante años, por lo que se requieren soluciones que puedan ser escalables y puedan ser aplicadas en un corto y mediano plazo en campo, tanto para cuerpos de agua como para su aplicación en suelos, por estos motivos, se utilizarán soportes de inmovilización con características deseables para su futuro escalamiento como son poliuretano zeolitas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Seleccionar microorganismos ligninolíticos que sean capaces de degradar glifosato.
- Caracterizar fisicoquímicamente muestras suelo y cuerpos de agua de zonas cultivables.
- Propagar e inmovilizar por lo menos un hongo y las enzimas ligninolíticas en soportes poliméricos inertes como poliuretano y zeolitas.
- Desarrollar estrategia experimental para la degradación de glifosato en suelos y agua contaminados empleando microorganismos y enzimas inmovilizados en poliuretano y zeolitas.

Metodología y actividades realizadas

El proyecto se dividió en 3 etapas como se describen a continuación:

1er etapa: (a) muestreo de zonas de cultivo y (b) selección de los microorganismos degradadores del glifosato.

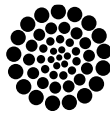
a) Muestreo en zonas de referencia y zonas libres de herbicidas.

Muestreo en zonas de referencia y zonas libres de herbicidas.

En esta etapa se trazaron polígonos en las zonas de cultivo para la toma de muestras de suelo y agua donde se conoce aplican glifosato y en zonas libres del herbicida como son los pozos



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



de agua particulares de los cuales las personas que viven aledañas a las zonas de cultivo usan el agua para el aseo personal, consumo personal y de sus animales domésticos, aseo de sus viviendas, entre otras necesidades básicas. La selección de los sitios de muestreo se llevó a cabo basados en estudios previos donde llevó a cabo la detección de glifosato en cuerpos de agua durante el 2013-2014 (Ruiz-Toledo 2014). Por otro lado, se tomó en cuenta el registro de la cantidad de hectáreas en las que se ha sembrado diversos cultivos en donde aplican glifosato desde el 2012, publicada en el portal del CONACYT/CIBIOGEM, ubicando al Soconusco como principal productor de soya en el estado de Chiapas con 20 mil toneladas anuales y mas de 7mil has sembradas (SIAP, 2015; www.cibiogem.gob.mx/OGMs/Paginas/Permisos.aspx).

A partir de esta información, se seleccionaron los sitios con mayor concentración del herbicida glifosato. Los suelos y cuerpos de agua se analizaron para determinar la presencia de glifosato.

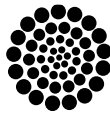
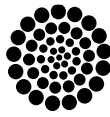


Tabla . Coordenadas de las muestras de agua y suelos analizadas.

Tipo de muestra	muestra	Nombre de la Muestra	Norte	Oeste
agua	1	Rio Cahoacán 1	14°37'6"	92°19'00"
agua	2	Rio Coatán 1	14° 53' 55.1"	92°21'35.2"
agua	3	Agua de lavado	14°43'45.5"	92°19'4.3"
agua	4	Canal de riego 1	14°37'55.2"	92°18'54.2"
agua	5	Rio Cahoacán 2	14°47'03.2"	92°15'37.7"
agua	6	Pozo 1	14° 45' 45.5 "	92° 18' 12.7"
agua	7	Pozo 2	14° 45' 36.4 "	92° 18' 7.2"
agua	8	Pozo 3	14° 43' 27.1"	92° 16'14.7"
agua	9	Pozo 4	14° 40' 8.2"	92° 17' 29.8"
agua	10	Pozo 5	14° 38' 33.6"	92° 18' 28.5"
agua	11	Canal de riego 2	14° 42' 57.3"	92° 18' 26.3"
agua	12	Rio Cahoacán 3	14° 37' 25.7"	92° 19' 3.8"
agua	13	Pozo 6	14° 46' 6.5"	92° 15' 51.2"
agua	14	Pozo 7	14° 44' 56.7"	92° 19' 6.6"
agua	15	Canal de riego 2	14° 37' 55.2"	92° 18' 54.3"
agua	16	Rio Coatán 2	14° 50' 19.1"	92° 24' 11.1"
agua	17	Rio Coatán 3	14° 51' 21.6"	92° 25' 53.1"
agua	18	Rio Coatán 4	14° 51' 57.2"	92° 25' 25.3"
agua	19	Rio Coatán 5	14° 49' 58.0"	92° 28' 12.3"
agua	20	Rio Coatán 6	14° 48' 0.005"	92° 30' 30.1"
suelo	21	Rio Coatán 7	14° 48' 0.005"	92° 30' 30.1"
suelo	22	Rio Coatán 8		
suelo	23	Rio coatán 2 rio seco	14°54'26.2"	92°24'20.5"
suelo	24	rio coatan 3.1 terreno agri	14°51'57.1"	92°25'25.3"
suelo	25	orilla rio coatan 4		
suelo	26	punto Daniel	14° 43' 44.7"	92° 19' 6.70"
suelo	27	desembocadura cahuacan	14°37'25.7"	92°19'03.8
suelo	28	coatan 2 bananera	14° 54' 26.2"	92° 24' 20.5"
suelo	29	canal de riego	14°47'08.8"	92°16'04.5"
suelo	30	pozo Daniel	14°44'56.7"	92° 19' 6.6"
suelo	31	Rio Cahoacán 1	14°37'6"	92°19'00"

Determinación de la calidad del agua

La determinación de los parámetros de calidad de agua se llevarán a cabo mediante análisis estandarizados validados por la Environmental Protection Agency (EPA) utilizando el equipo HACH, los parámetros analizados fueron:



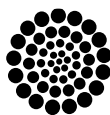
Los sitios seleccionados correspondieron a las zonas de cultivos para la toma de muestras de suelo y agua en donde se aplica glifosato así como también en zonas en donde no se aplica el herbicida como son pozos particulares de consumo de agua de los agricultores que viven en zonas aledañas de las parcelas de cultivo. Los criterios de selección de los sitios de muestreo se basaron en un estudio previo realizado por Ruiz-Toledo 2014 en el cual se reportó la presencia de glifosato en diferentes cuerpos de agua durante los años 2013 y 2014 los cuales incluyeron sitios donde se aplica el glifosato y sitios que deberían estar libres del herbicida, sin embargo la presencia de este se encontró en ambos tipos de sitios.

Determinación de la calidad del agua

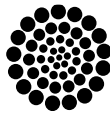
Se determinaron los parámetros de calidad de agua mediante análisis estandarizados validados por la Environmental Protection Agency (EPA) utilizando el equipo multiparamétrico HANNA modelo HI98194. Se emplearon muestras de agua que fueron transportadas al laboratorio y almacenadas en refrigeración.

El pH de las muestras se encontró en el intervalo de 7.1 a 7.85, la conductividad eléctrica entre 93 a 633 $\mu\text{S}/\text{cm}$, los Sólidos totales disueltos de 0.05 a 0.316 ppt y la salinidad de 0.5 a 0.1 ups. Estos valores indican condiciones propicias para la existencia de plantas y animales, así como para sus procesos ecológicos e interacciones. En el caso de las muestras de agua de pozos son las que presentaron los valores mayores observado para estos cuatro parámetros.

Tabla . Análisis de muestras de agua. Mediciones de pH, Conductividad eléctrica, Sólidos disueltos totales y salinidad del Río Cahoacán, Río Coatán, canales de riego y pozos.



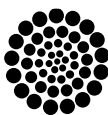
	Potencial de H	Conductividad Eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Sólidos disueltos totales (ppt Tds)	Salinidad (PSU)	Fuente de agua
M1	7.67	100	0.05	0.05	Río Cahoacán
M2	7.69	151	0.076	0.07	Río Coatán
M3	7.46	362	0.181	0.17	Agua de lavado
M4	7.32	237	0.119	0.11	Canal de riego
M5	7.38	93	0.046	0.04	Río Cahoacán
M6	7.8	536	0.268	0.26	Pozo
M7	7.53	362	0.181	0.17	Pozo
M8	7.57	335	0.167	0.16	Pozo
M9	7.7	497	0.248	0.24	Pozo
M10	7.83	633	0.316	0.31	Pozo
M11	7.62	130	0.065	0.06	Canal de riego
M12	7.6	101	0.05	0.05	Río Cahoacán
M13	7.85	573	0.286	0.28	Pozo
M14	7.62	367	0.183	0.18	Pozo
M15	7.75	352	0.76	0.17	Canal de riego
M16	7.46	192	0.096	0.09	Río Coatán



En la Tabla se muestran los datos de los parámetros fisicoquímicos realizados en muestras de agua, utilizando la técnica de HACH, siguiendo la metodología propuesta por Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry (AOAC, 1984) y Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 1999).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos en agua					
MUESTRA	Fosforo reactivo (PO4mg/L)	Sulfato (SO4g/L)	Nitrato (NO3mg/L)	Nitrito (NO2 g/L)	Amonio (NH4 mg/L)
1	0.43	14	0.9	5	ND
2	0.64	12	3.1	4	ND
3	0.92	14	1.7	7	ND
4	0.48	2	2	1	ND
5	0.3	58	5.5	7	ND
6	0.58	23	2	7	ND
7	0.65	6	4.7	3	ND
8	1.52	7	1.6	3	ND
9	2	44	1.2	3	4
10	1.96	17	4.3	3.6	2
11	0.4	80	4.6	9	ND
12	0.86	3	1.3	4	0
13	0.62	18	5.5	3	ND
14	0.85	21	1.2	1.2	1
15	0.14	25	0.8	6	ND
16	0.36	23	1	4	ND
17	0.47	27	0.8	3	0
18	0.35	23	1.1	5	ND
19	0.38	27	1.1	1	0
20	0.1	2	1	1	2

Concentración de glifosato de los diferentes sitios de muestreo



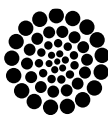
MUESTRAS DE AGUA	[GLIFOSATO] microgramos/L
1	31.3165
2	35.6197
3	33.7752
4	35.6197
5	34.4301
6	33.6493
7	32.7082
8	34.1102
9	37.0639
10	37.5082
11	35.7021
12	36.6803
13	33.9498
14	35.4869
15	36.9553
16	33.1769
17	36.3072
18	33.8323
19	37.4382
20	36.1525

Caracterización de suelos

Las muestras de suelo se secaron a temperatura ambiente, se trituraron en molino rotatorio, se eliminó previamente piedras y material vegetal visible. Se pasaron a través de un tamiz o colador (malla 2 mm). A cada muestra se le determinó pH, conductividad eléctrica

Determinación de pH:

A 10 g de suelo se le adicionaron 20 ml de agua destilada, se agitaron 1 m, después se dejan reposar 5 m, se repitió este procedimiento sei vsecas hasta completar un ciclo de 30 minutos. Posteriormente se leyó en el potenciómetro.



MUESTRAS DE SUELO	[GLIFOSATO] microgramos/L
21	32.6472
22	29.6843
23	34.2500
24	35.3232
25	30.4407
26	34.3140
27	31.9693
28	31.0780
29	31.9210
30	34.4454
31	26.5830

Propagación y selección de hongos que tengan la capacidad de degradar glifosato.

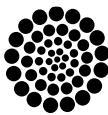
Alternativamente se realizaron en laboratorio la propagación de los diferentes hongos filamentosos ligninolíticos *P. chrysosporium*, *A. niger*, *Thielavia terrestris*, *Chaetomium sp.* y *Lichtheimia ramosa* para evaluar su capacidad de degradación del glifosato (García-Huante et al 2017; Aguilar-Najarro 2021; Peña-Maravilla et al 2017), de esta evaluación se seleccionaron dos microorganismos porque ya se tenían estudios de optimización de la obtención de enzimas ligninolíticas y porque se determinó que estos degradaron glifosato.

Los hongos seleccionados se utilizaron para la producción de las enzimas ligninolíticas.

Producción de los hongos seleccionados y obtención del extracto enzimático para la degradación de glifosato.

Propagación del hongo y producción de las enzimas ligninolíticas.

Los hongos seleccionados fueron propagados por fermentación en estado sólido. Debido a que ya se conocían sus requerimientos para la expresión de enzimas ligninolíticas y porque durante los estudios de remoción mostraron que si lograron remover el glifosato de las muestras a las cuales fueron expuestos.



Los protocolos de propagación para la expresión de las enzimas ligninolíticas se llevaron a cabo de acuerdo a lo reportado (Aguilar-Najarro 2021; Peña-Maravilla et al 2017).

La pulpa de café se obtuvo de la finca “La alianza” ubicada en el ejido de Ahuacatlán del municipio de Cacahoatán, Chiapas; y el bagazo de palma africana de la procesadora de palma africana SA (PAPSA), ubicada en el municipio de Villa Comaltitlán, Chiapas. Los sustratos, se lavaron para remover las impurezas como polvo o insectos plaga que pudieran tener cada uno de estos, después se secaron a 55 °C durante 24 horas, posteriormente se trituraron y se tamizó para obtener un tamaño de partícula de 700 micras, este se almacenó en bolsas de plástico selladas, y se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso posterior.

Propagación e inmovilización del hongo sobre el poliuretano.

El poliuretano es un material inerte con buenas propiedades mecánicas principalmente con una alta resistencia y elasticidad además de ser de bajo costo. Su porosidad es alta cercana al 97%, característica que permite poseer una superficie grande de adsorción, no sufre desgaste de material o de la afectación de sus características fisico-químicas o mecánicas al escalar los procesos (De Ory I et al 2008). Las esporas de los hongos seleccionados se inocularon sobre cuadros de poliuretano de 1 cm³ en medio líquido con la siguiente composición (g/L): Glucosa (10); extracto de malta (10); peptona (2); extracto de levadura (2); asparagina (1); KH₂PO₄ (2); MgSO₄ 7H₂O (1); Tiamina (0.1); agar (20).

La propagación de los hongos se llevó a cabo en el medio líquido descrito Y a partir de estos se logró la producción de los extractos enzimáticos con los cuales se llevó a cabo los estudios de inmovilización de enzimas y las posteriores remociones de glifosato.

La producción del micelio de los hongos seleccionados fue analizado y observado por microscopía óptica.

Observación de los hongos inmovilizados en poliuretano por microscopía:

Reporte de observaciones en el microscopio

Ambos hongos fueron observados por microscopía óptica a 5X, 10X, 40X y algunos a 100X

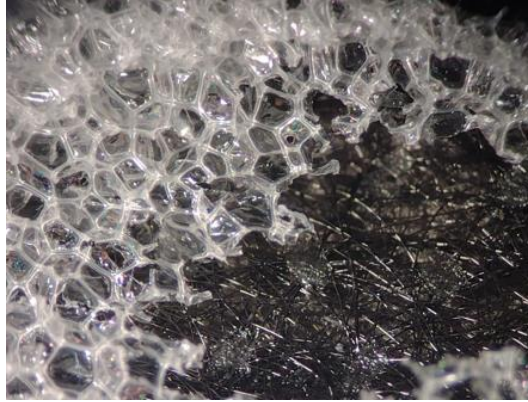


Figura 1. Esponja de poliuretano sin colonizar

Inmovilización de *Aspergillus niger* en poliuretano

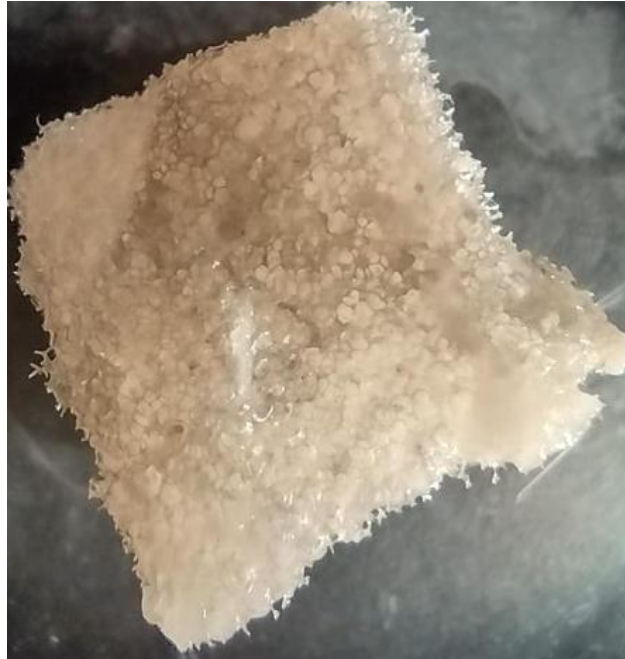


Figura. Esponja de poliuretano colonizado con *A. niger* observado con estereoscopio. En la imagen se pueden observar las esporas características de *A. niger* en color negro.

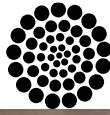
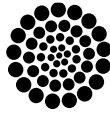


Figura. Esponja de poliuretano colonizado con *A. niger* observado con estereoscopio. En la imagen se pueden observar las esporas características de *A. niger* en color negro.

Lo primero que se observó en este parámetro es que el crecimiento que tuvo el hongo *Aspergillus* fue un crecimiento hacia la zona periférica del cubo ya que la mayor concentración de hifas fue en estas zonas. En la parte central del cubo la concentración de las hifas fue menor y siempre en las paredes de los poros, en el centro de dichos poros solamente se observaron las esporas en grandes cantidades. Las esporas se encontraron también en la parte superior del cupo, posiblemente tengan menor densidad con respecto al agua.

Al observar a este aumento se logró observar los cuerpos fructíferos de los hongos se localizaron en las zonas con mayor concentración de hifas siempre en la periferia del cubo. Al hacer una búsqueda de dichos cuerpos en la parte central estos fueron disminuyendo conforme se alejaban de las paredes y al centro de cada poro se concentraban las esporas en grandes cantidades. Las hifas se aprecian septadas, igualmente se puede observar como se formaron algunos racimos de los cuerpos fructíferos, al parecer se formaron en las zonas mas cercanas a los poros en dirección al centro del poro, siempre en la zona de la pared de los poros.



Muestras de biopelículas

En las biopelículas los cuerpos fructíferos se formaron en las zonas aglomeradas de hifas se observo a mayor detenimiento que existe septos dentro de las hifas con una variación en la longitud de los mismos. Igualmente existe una mayor cantidad de esporas solamente que estas están distribuida homogéneamente entre las hifas, igualmente se hizo notar la diferencia en la densidad de las muestras.

Observación a 40x

Muestras en cubo

Las hifas observadas se aprecian con mayor detalle los septos formados, se pueden observar igualmente la formación de los cuerpos fructíferos y los racimos de los mismos.

Muestras en biopelículas

Las hifas se aprecian cada vez más septadas con diferenciación en la longitud, los cuerpos fructíferos fueron observados dentro de las zonas con mayor aglomeración pero se hace notar que la formación de racimos no se encontraron en las muestras de biopelículas.

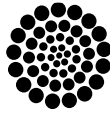
Phanerochaete chrysosporium

Observación a 5x

Muestras en cubo



Figura. Cubo de poliuretano colonizado con *P. chrysosporium*.



Lo primero que se observa es la presencia de esporas en buena cantidad pero menor en comparación a las de aspergillus, la forma del crecimiento fue generalizada dentro del cubo, con la peculiaridad de que creció desde las paredes del cubo donde se concentraron las hifas al parecer hasta obtener una buena concentración ya que conforme se dirige hacia el centro del poro las hifas se comienzan a separar en forma de ramas o brazos individuales hacia otra pared del poro donde las hifas observadas comenzaban a aumentar en concentración simulando el mismo procedimiento.

Los cuerpos fructíferos observados fueron de forma generalizada principalmente en las zonas de mayor de concentración de hifas sin embargo, se pudieron observar en los extremos de las zonas de mayor concentración de hifas.

Muestras de biopelícula.

Las muestras de biopelículas presentaron estructuras grandes de mayor tamaño a los cuerpos fructíferos, se encontraron estas estructuras en diferentes zonas donde la concentración de hifas era mayor. Las esporas se avistaron en la periferia de la biopelícula observada.

Observación a 10x

Muestras en cubo

En esta observación se aprecia mejor lo descrito anteriormente con respecto al crecimiento en forma de arbusto debido a la aglomeración de las hifas. Se aprecia que los cuerpos fructíferos descritos anteriormente se presentan de forma secuenciada, es decir se aprecia el cuerpo fructífero al extremo de la hifa de origen, pero antes de la zona apical se formó una segunda estructura similar al cuerpo fructífero. Este tipo de estructuras fueron observadas en varias secciones junto a las estructuras normales de los cuerpos fructíferos.

Igualmente se logró observar la presencia de esporas o cuerpos fructíferos aglomerados en las zonas cercanas al centro de los poros. No se logró observar la presencia definida de los septos dentro de las hifas pero si se distingue una especie de separación dentro de las hifas similares a los que se presentarían por la presencia de los septos.

Muestras en biopelícula

Las muestras observadas indican la presencia de las estructuras fructíferas secuenciadas pero en menor cantidad, al igual que en la muestra en cubo no se distinguen la formación de los septos dentro de las hifas.

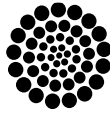
Observación a 40x

Muestras en cubo.

Las estructuras observadas indican una gran profundidad de hifas dentro de la zona mas cercanas a la pared del poro de los cubos, no se distinguen los septos con facilidad dentro de las hifas. Se determino que los tamaños de los cuerpos fructíferos secuenciados son muy similares entre sí, donde los que se encuentran en los extremos son ligeramente mayores. Se pudieron apreciar algunas estructuras de cuerpos fructíferos separadas de la hifa en las zonas con mayor concentración de las hifas.

Muestras en biopelícula

La mayoría de las estructuras observadas son similares a las detalladas en el apartado anterior, sin embargo la cantidad de estructuras secuenciadas es menor y la aglomeración de las esporas o cuerpos fructíferos son bastante escasos.



Inmovilización de enzimas.

Los extractos enzimáticos se inmovilizaron sobre 3 soportes Lifetech ECR 8806, Lifetech ECR1090 y Lifetech ECR1030 los cuales se utilizan para el escalamiento por sus características de porosidad y tamaño de partícula. Estas resinas se utilizan para la inmovilización de varios kilos hasta cientos de kilos de enzimas inmovilizadas, debido a que son partículas esféricas en el rango de 150 a 300 μm , ya que brindan altas actividades enzimáticas y un rendimiento óptimo y se recomiendan en sistemas para ser escalados.

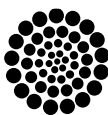
Degradación del glifosato con los sistemas inmovilizados

La degradación se llevó a cabo en lote debido a que los reactivos aún no han llegado, pero se hizo una modificación en esta actividad y la inmovilización se realizó con otras resinas que también sirven para el escalamiento. La inmovilización en el soporte comprometido se realizará en las siguientes semanas. Para entregar el reporte en forma aunque no en tiempo. La justificación se encuentra en el apartado del cumplimiento de las actividades correspondiente al Anexo 1 de avances.

Los análisis de degradación de glifosato se llevaron a cabo por espectrofotometría usando el kit de ELISA Glyphosate Magnetic Particle Kit Abraxis Inc siguiendo las instrucciones del fabricante.

La meta y cada uno de los objetivos de este trabajo se cumplieron al 100% ya que se logró obtener la remoción del glifosato en diferentes sistemas evaluados: el 5% usando extractos enzimáticos de *A. Niger* en la resina lifetech ECR 8806; 20% usando extractos enzimáticos de *A. niger* inmovilizados en la resina Lifetech ECR1090M; 27% usando extractos enzimáticos de *A. niger* inmovilizados en la resina Lifetech ECR1030M; 11% usando el hongo *A. niger* inmovilizado en poliuretano y 9% usando el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en poliuretano.

En la Tabla 3 se observan los datos finales de concentración de glifosato de los experimentos realizados para la degradación del contaminante, donde



estuvieron en contacto las cepas con las muestras de suelo (muestra 24) y agua (muestra 10), las cuales fueron las que presentaron mayor concentración de dicho contaminante, como se muestra en la Tabla 2.

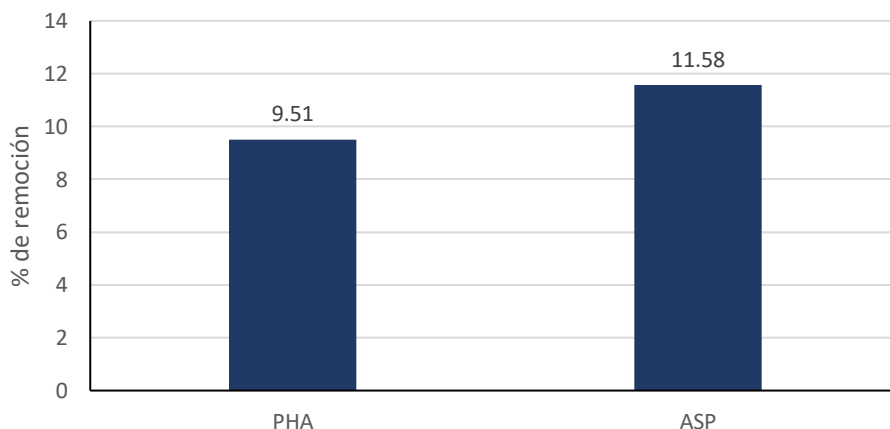
Tabla 3. Concentración de glifosato en experimentos de remoción

Microorganismo	Tipo de muestra	Tiempo (Horas)	[µg de glifosato/L]
PHA	AGUA	36	4.78
ASP			4.67
PHA	SUELO	84	4.47
ASP			4.60
ASP 1030	INMOVILIZADOS	12	3.82
ASP 8806			5.01
ASP 1090			4.22

PHA *Phanerochaete chrysosporium*
ASP *Aspergillus niger*

En la Gráfica 1 se observa la degradación de los hongos *Phanerochaete chrysosporium* y *Aspergillus niger* en las muestras de agua. Mientras que en la Gráfica 2 se observa la degradación del glifosato de los extractos crudos enzimáticos inmovilizados en las resinas ECR 8806, ECR 1090 Y ECR1030.

Hongos inmovilizados en poliuretano vs % de remoción de glifosato en muestras de agua



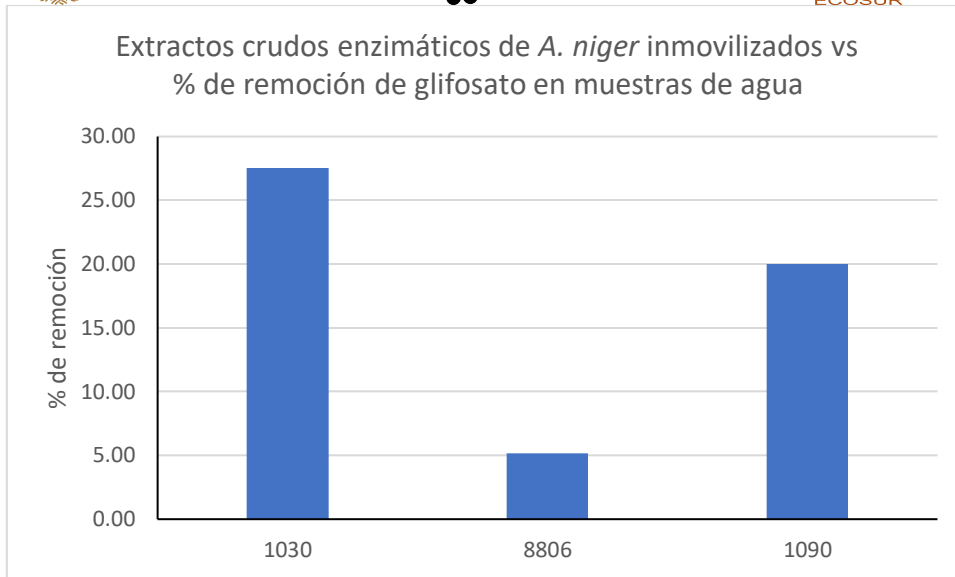
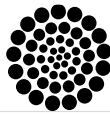
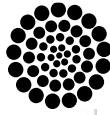


Tabla. Cantidad de proteína de *A. niger* inmovilizado en las tres resinas de inmovilización y cantidad de proteína residual de la fracción que no se inmovilizó en las resinas.

Proteína

Muestra	mg/L
ECR 8806 C/R	0.466
ECR 8806 S/R	0.68
ECR 1090 C/R	0.449
ECR 1090 S/R	0.699
ECR 1030 C/R	0.552
ECR 1030 S/R	0.606



Actividad Lacasa	
Muestra	U/L
ECR 8806 C/R	1209.259
ECR 8806 S/R	111.111
ECR 1090 C/R	537.037
ECR 1090 S/R	0
ECR 1030 C/R	274.074
ECR 1030 S/R	135.185

Datos de actividad lacasa encontrada en los extractos enzimáticos inmovilizados de *A. niger*. Las enzimas inmovilizadas en la resina Lifetech ECR1030 son las que mostraron cantidades mas altas de remoción de glifosato.

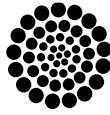
Conclusiones finales:

Los sistemas propuestos para la remoción de glifosato mostraron resultados favorables. Estos consistieron en *A. niger* y *P. chrysosporium* inmovilizados en poliuretano los cuales lograron remover el glifosato contenido en las muestras de agua recolectada de zonas de cultivo donde se aplica glifosato, así como también sus extractos enzimáticos al ser inmovilizados sobre las resinas estudiadas mostraron remoción del glifosato de las muestras de agua. Por otro lado, ambos hongos no mostraron degradación del glifosato presente en suelos, por lo que se deberán realizar estudios de optimización para lograr la remoción del herbicida. Se deben buscar nuevos métodos o mejorar el protocolo para llevar a cabo la remoción del glifosato en este tipo de muestras.

Los archivos de datos de Excel, imágenes de los resultados se encuentran en la siguiente carpeta, en la cual se colocarán los resultados comprometidos en la propuesta original. Para sumar a los que se entregan en este reporte técnico. Aclarando que los objetivos y metas se cumplieron al 100%. Sin embargo, es importante para nuestro grupo de trabajo entregar lo comprometido con la convocatoria.



**GOBIERNO DE
MÉXICO**



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



[Anexos reporte técnico sistemas inmovilizados que degradan glifosato](#)