

FORMATO PARA EL REPORTE FINAL

1. PRESENTACIÓN DEL PROYECTO.

1.1. DATOS DEL RESPONSABLE TÉCNICO

María Claudia Villicaña Torres, Investigadora por México, CVU 166471.

1.2. TÍTULO DESCRIPTIVO DE LA PROPUESTA

Aislamiento de bacterias degradadoras de glifosato y AMPA: alternativas biológicas para la biorremediación de suelos contaminados.

2. DATOS GENERALES DEL PROYECTO

NOMBRE DEL PROYECTO	Aislamiento de bacterias degradadoras de glifosato y AMPA: alternativas biológicas para la biorremediación de suelos contaminados.
ÁREA DE DESARROLLO:	DESARROLLO TECNOLÓGICO (TRL 5 EN ADELANTE)
OBJETIVO GENERAL	Formular un consorcio bacteriano sintético capaz de degradar el glifosato y su derivado AMPA como una alternativa para la biorremediación de suelos contaminados.
TIEMPO DE EJECUCIÓN (meses)	6
RELEVANCIA DEL PROYECTO (máximo 300 palabras)	El glifosato es un herbicida utilizado ampliamente en agricultura, el cual puede acumularse en suelo provocando efectos negativos en la biota asociada. El glifosato es degradado en los suelos por mecanismos microbiológicos generando ácido aminometil fosfónico (AMPA) como metabolito mayoritario, el cual sigue siendo altamente tóxico para los seres vivos. En la actualidad, se busca reducir el uso de glifosato a través de alternativas amigables con el ambiente para disminuir la contaminación por estos compuestos. Sin embargo, muchos suelos ya impactados por la acumulación de glifosato y AMPA representan focos potenciales que pudieran contaminar cuerpos de agua, alimentos y la biota causando efectos negativos en el ecosistema y en la salud humana, denotando la importancia de la biorremediación de los suelos. Una de las estrategias de biorremediación consiste en la utilización de microorganismos con capacidad para degradar el glifosato y sus derivados, donde se han aislado bacterias

	<p>degradadoras de glifosato siendo algunas de ellas objeto para la generación de patentes. En México son pocos los trabajos que se han realizado en el aislamiento de bacterias y otros microorganismos autóctonos tolerantes o degradadores de glifosato y sus derivados (Ortiz-Hernández y Sánchez-Salinas, 2010; Ortiz-Perez et al. 2019; Cota-Alvarez 2021). Por tal, la relevancia de este proyecto radica en que se propone el aislamiento y caracterización de bacterias de suelos agrícolas contaminados de la región de Sinaloa que presenten potencial degradador de glifosato y AMPA para generar consorcios microbianos que puedan aplicarse en la biorremediación de suelos. Esta alternativa resulta atractiva puesto que el consorcio microbiano resultante estará conformado por cepas bacterianas del microbiota natural de los suelos de la región buscando con ello reducir efectos nocivos en el ecosistema y la contaminación por estos químicos.</p>
<p>RESULTADOS E IMPACTOS (máximo 300 palabras)</p>	<p>Los resultados de la presente propuesta consistirán en una colección de cepas bacterianas caracterizadas bioquímica y molecularmente, así como un consorcio bacteriano sintético degradador de glifosato y AMPA, los cuales representarán herramientas para la biorremediación de suelos contaminados con estos agroquímicos. Estos resultados así como un cepario disponible constituyen la base para el diseño de otros consorcios así como realizar pruebas experimentales en campo para demostrar la efectividad del consorcio sintético en la degradación de glifosato y AMPA en suelos altamente contaminados, sentando las bases para vislumbrar el diseño de un proceso de manufactura y licenciamiento de un producto biotecnológico. Los usuarios potenciales de esta tecnología basada en microorganismos lo constituyen los agricultores para la descontaminación de suelos agrícolas, lo cual además reducirá la contaminación de cuerpos de agua, alimentos y los efectos tóxicos en seres vivos debido a la exposición con suelos contaminados. Por todo lo anterior, el impacto de dichos resultados principalmente se reflejará en la reducción de ambientes contaminados y restauración de suelos, tarea llevada por agricultores o por instituciones de gobierno en programas de restauración de ecosistemas dañados; se espera una reducción de los efectos en salud humana al reducir las fuentes de contaminación; se contribuirá con la generación de</p>

3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.

3.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La agricultura es una de las actividades económicas más relevantes en el estado de Sinaloa, cuenta con poco más de 1 millón de hectáreas sembradas y es principal exportador de alimentos, por lo que se ha estimado se emplean alrededor de 700 toneladas anuales de plaguicidas para evitar pérdidas por ataque de plagas (Arellano-Aguilar et al. 2017). El volumen de producción de plaguicidas en México para 2017 fue de 59 157 ton (INEGI, 2018) y del total de plaguicidas utilizados en la zona noroeste, Sinaloa se aplica cerca del 30% (Leyva et al. 2014). De estos, algunos se clasifican como Plaguicidas Altamente Peligrosos (PAPs), siendo extremadamente peligrosos y mortales si son inhalados, así como carcinógenos, probables carcinógenos, mutagénicos, bioacumulables, persistentes en agua, suelo o sedimento, y muy tóxicos en organismos acuáticos y abejas. Los estados de Sonora y Sinaloa utilizan entre un 40 y 50% de PAPs, destacando por su alta toxicidad: paratión metílico, malatión, metamidofos, clorpirifós, monocrotofos, paraquat, glifosato, carbofurán, metomilo, mancozeb, clorotalonil, dimetoato, carbarilo, atrazina, fosfuro de aluminio, imidacloprid, cipermetrina, lambda cialotrina y endosulfán (Hernández et al. 2018)

El glifosato es un fosfonato sintético utilizado como herbicida no selectivo aplicado extensamente para la eliminación de hierbas y de arbustos en los cultivos, considerado por mucho tiempo como un herbicida que no afectaba al medio ambiente, pero la preocupación ha ido aumentando por los posibles efectos en animales y en la salud humana. El movimiento de este y otros plaguicidas en el suelo puede ocurrir debido a las precipitaciones, la lixiviación, el desbordamiento de la superficie, el drenaje subterráneo y la transferencia de nutrientes minerales del suelo a los productos agrícolas. El uso excesivo de glifosato y los metabolitos derivados de su degradación provoca que estos compuestos permanezcan más en el suelo, provocando la degradación del suelo y pudiendo ocasionar contaminación secundaria de cuerpos de agua, suelo, plantas y alimentos, impactando diferentes ecosistemas, así como también la salud humana (Mamy et al. 2016).

La degradación del glifosato en los suelos es impulsada principalmente por el cometabolismo microbiano, donde las bacterias se encuentran entre los microorganismos comúnmente estudiados por su capacidad de utilizar glifosato como fuente de P inorgánico (Pi) y como fuente de nitrógeno (N), C o ambos. El metabolismo de las bacterias del suelo que pueden degradar glifosato y otros fosfonatos, se lleva a cabo principalmente por dos vías. La primera es la vía C-P liasa, el glifosato es transportado y escindido por medio de un conjunto de proteínas codificadas en el operón *phn*, produciendo fósforo inorgánico y sarcosina, que luego es metabolizada por la sarcosina oxidasa a glicina y formaldehído. Por otra parte, la vía AMPA produce glioxilato y ácido aminometilfosfónico (AMPA) a partir del glifosato. El AMPA es el principal y metabolito mayoritario durante la degradación biológica del glifosato. Tiene un rango de toxicidad similar al del glifosato, por lo tanto, se convierte en la fuente de contaminación secundaria en el medio ambiente. Interesantemente, también se han reportado bacterias que utilizan AMPA como fuente de Pi. Debido a que el AMPA aún conserva el enlace C-P, puede canalizarse a la vía CP-liasa para una degradación completa. Entre las muchas proteínas involucradas, el complejo central *phnGHIJK* y la proteína *phnJ* tienen un papel clave en el corte del enlace C-P, actuando específicamente como C-P liasa (Singh et al. 2020). Es por ello que aquellas bacterias que expresan estas proteínas que degradan glifosato y AMPA, tienen potencial para ser utilizadas en un proceso biotecnológico, conocido como biorremediación.

La biorremediación es una tecnología donde se utiliza plantas o microorganismos, que convierten o degradan los productos químicos tóxicos en componentes menos tóxicos o no tóxicos, lo que nos brindan posibilidades para procedimientos de descontaminación. Se ha reportado de algunas bacterias para la biorremediación en entornos contaminados con glifosato, como *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Burkholderia gladioli* y *Flavimona soryzihabitans* que han demostrado ser eficaces en la degradación de este plaguicida (Martínez-Nieto et al. 2012).

Bacillus cereus CB4 se reportó con capacidad de degradar concentraciones hasta de 12 g/L (12,000 ppm) de glifosato en cultivo y además se identificaron las vías metabólicas relacionadas con la actividad de CP liasa y de glifosato oxidoreductasa degradando el glifosato a AMPA, glioxilato, sarcosina, glicina y formaldehído como productos (Fan et al. 2012). Liang et al. (2020) reportaron la abundancia de bacterias oxidantes de azufre, como *Sulfurifustis*, *Sulfuriferula* y *Thiobacillus* durante la eliminación de glifosato y nutrientes de efluentes agrícolas, formando parte del proceso de remediación. De estos y otros trabajos acerca del aislamiento de bacterias degradadoras de glifosato, se han patentado algunas bacterias y consorcios principalmente de Francia y China (patentes CN201911095758.7A y WO1992019719A1), pero no incluido México. Para que las bacterias desempeñen su máximo rendimiento en el proceso de biodegradación, se propone la utilización de consorcios (grupos coexistentes de dos o más especies microbianas) que actúen de manera sinérgica para la biotransformación del contaminante de interés y realicen la degradación completa del contaminante. El intercambio de metabolitos o señales entre los miembros de un consorcio, permite realizar diversas reacciones bioquímicas complejas y paralelas o secuenciales, aumentando la eficiencia de la utilización de los recursos y reduciendo la formación de subproductos. En un consorcio natural, es difícil saber qué especies participan realmente en la biorremediación. Por lo tanto, un consorcio sintético (cultivo de dos especies microbianas en condiciones bien definidas de interacción y función) es un método prometedor para la biorremediación no solo porque cumplen con las funciones deseadas, sino también mantiene el crecimiento celular de manera estable.

En México, Ortiz-Pérez et al (2019) aislaron e identificaron bacterias del género *Bacillus*, *Microbacterium*, *Bordetella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas* y *Achromobacter* en suelos agrícolas en Tamaulipas las cuales mostraron ser capaces de tolerar distintos pesticidas, entre ellos el glifosato, y utilizarlos como única fuente de carbono y energía. Por otra parte, Cota-Alvarez (2021) identificó y caracterizó la capacidad de tolerancia (CT) a diferentes concentraciones de glifosato, carbofurán, permetrina y clorpirifós de cepas bacterianas y consorcios del genero *Bacillus* en suelos agrícolas de Guasave, Sinaloa. Sin embargo, en estos trabajos no se llegó al diseño de un consorcio para evaluar la remoción de glifosato en suelo, lo cual representa una ventana de oportunidad para la presente propuesta. El uso de microorganismos autóctonos, altamente tolerantes y funcionales para una biodegradación sostenible de glifosato brindan la posibilidad de ser utilizados para la desintoxicación *in situ* de ambientes severamente contaminados (Ortiz-Hernández y Sánchez-Salinas, 2010), teniendo como principales ventajas el evitar la introducción de bacterias extrañas en el sistema ecológico. Por tal, debido a la necesidad de resolver el problema de acumulación de glifosato y sus derivado AMPA, en este proyecto se propuso aislar y caracterizar bacterias de suelos agrícolas con capacidad degradadora de glifosato y AMPA para el diseño de un consorcio que promueva los procesos de biorremediación tomando ventaja de la maquinaria metabólica de microorganismos autóctonos de la región.

3.2. JUSTIFICACIÓN. Con fundamento en elementos cualitativos y cuantitativos, problemática a atender u oportunidad de desarrollo detectada, misma que será atendida mediante la implementación del proyecto y la transferencia de los resultados.

En México en el año 2017, se reportó un volumen de producción de 59 157 ton de plaguicidas, siendo Sinaloa y Sonora de los principales estados agrícolas consumidores. De los plaguicidas mayormente aplicados en cultivo, se encuentra el glifosato, el cual es un compuesto organofosforado que se utiliza ampliamente en el control de malezas. El glifosato es degradado en los suelos por mecanismos físicos, químicos y microbiológicos generando ácido aminometil fosfónico (AMPA) como metabolito mayoritario, que continúa siendo altamente tóxico para los seres vivos. Sin embargo, el uso excesivo de glifosato y otros agroquímicos puede saturar los procesos ambientales y biológicos de degradación dando como resultado la prolongación de la vida media del herbicida y sus derivados en el ambiente contribuyendo con la acumulación en el suelo y disminuyendo su fertilidad. La acumulación prolongada de glifosato y AMPA subsecuentemente pueden contaminar cuerpos de agua, animales y plantas por el arrastre de aguas por lluvia o por exposición con el suelo, generando diversos impactos ambientales y problemas

de salud al ser humano. Por tal, en la actualidad, además de buscar alternativas para reducir el uso de glifosato, también existe un interés en la biorremediación de los suelos dado que una gran extensión ya ha sido impactada por la acumulación de glifosato y AMPA representando focos potenciales de contaminación. De aquí que el uso de microorganismos que degradan estos compuestos representa una estrategia prometedora para la biorremediación de suelos altamente contaminados. La obtención de consorcios bacterianos en suelos tratados con glifosato nos permite aprovechar la maquinaria metabólica de microorganismos nativos de la región para la biorremediación de suelos impactados y con ello reducir la contaminación. Por tal, en este proyecto se propuso el aislamiento de cepas bacterianas degradadoras de glifosato y AMPA para el diseño de un consorcio sintético con capacidad de degradación de glifosato y AMPA *in vitro* y en un contexto de microcosmos, como paso inicial en la generación de una tecnología basada en microorganismos para biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas.

3.3. OBJETIVO GENERAL

Formular un consorcio bacteriano sintético capaz de degradar el glifosato y su derivado AMPA como una alternativa para la biorremediación de suelos contaminados.

3.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. Breve descripción de cada uno de ellos.

Objetivo 1. Aislar e identificar cepas bacterianas degradadoras de glifosato y AMPA a partir de muestras de suelos agrícolas contaminados.

Descripción: Consistió en la toma de muestra de suelo de 2 sitios agrícolas expuestos a glifosato, las cuales se procesaron para el aislamiento de las cepas bacterianas que utilicen como fuente de carbono o fosfato el glifosato y AMPA. Los aislados obtenidos se identificaron molecularmente por el gen 16S rRNA, caracterizaron por pruebas bioquímicas y se realizó la detección por PCR de genes *phn* asociados a las vías de degradación de glifosato y sus derivados, como paso inicial para obtener los agentes biológicos que se utilizarán en la formulación del consorcio bacteriano.

Objetivo 2. Evaluar la capacidad de tolerancia al glifosato y AMPA de las cepas bacterianas y en consorcios en ensayos de cultivo *in vitro*, así como su capacidad de remoción de glifosato.

Descripción: Una vez obtenidos las cepas bacterianas capaces de crecer en medios con glifosato o AMPA, se evaluó la tolerancia a concentraciones crecientes de glifosato (1000, 5000, 10000 y 15000 ppm) y AMPA (100 y 500 ppm) en medio sólido como primer tamiz para seleccionar las cepas más tolerantes a glifosato y AMPA. Se seleccionaron 8 cepas (4 de glifosato y 4 de AMPA) para el ensayo de remoción en medio MSM1 suplementado con 1000 ppm de glifosato teniendo como tratamientos cepas puras y combinaciones para el consorcio, creciendo por 7 días. De este ensayo *in vitro*, se colectaron muestras para analizar con una microplaca basada en ELISA para detección de glifosato y obtener evidencia de la combinación de cepas con mayor actividad de remoción de glifosato y decidir la composición del consorcio.

Objetivo 3. Evaluar la degradación de glifosato y AMPA de un consorcio bacteriano sintético en un modelo de microcosmos de suelo.

Descripción: la actividad degradadora de glifosato y AMPA del consorcio seleccionado se evaluará en un contexto de microcosmos de suelo, donde muestras de suelos libres de glifosato y AMPA serán autoclaveados, se contaminarán experimentalmente en laboratorio con glifosato y se inocularán con el consorcio bacteriano. La

presencia de glifosato y AMPA se cuantificará por UPLC-MS para obtener datos más precisos de la capacidad degradadora del consorcio en estudio.

METAS

-Generar una colección de cepas bacterianas con capacidad para degradar el glifosato y AMPA que constituyan la base para el diseño de consorcios sintéticos.

-Generar un consorcio bacteriano con capacidad para degradar el glifosato y AMPA como una estrategia para el mejoramiento y restauración de suelos contaminados.

-Probar a nivel de microcosmos la efectividad del consorcio bacteriano en la remoción de glifosato y AMPA, que darán la pauta para evaluar su efectividad en estudios de campo, parámetros de aplicación, y a futuro, el diseño y licenciamiento de un producto biotecnológico.

3.4. ACERCAMIENTO TEÓRICO Y CONCEPTUAL. Descripción de la metodología que se empleó durante la ejecución del proyecto (técnicas, procedimientos, factores, variables e indicadores).

Aislamiento de cepas por enriquecimiento con glifosato y AMPA.

Para el aislamiento de las cepas bacterianas, se colectó una muestra de suelo de dos sitios: 1) periferia de invernadero de Fundación Produce Sinaloa, y 2) Campo agrícola localizado en la Sindicatura de Costa Rica, Sinaloa, ambos sitios con antecedentes de exposición a glifosato. Se tomaron al menos 400 g de suelo a una profundidad de 30 cm, se eliminaron las rocas y residuos vegetales de las muestras y se almacenaron en bolsas de plástico estériles a 4°C para su traslado al laboratorio. Se almacenaron a 4°C hasta el aislamiento que se realizó en máximo 5 días posteriores al muestreo. El aislamiento de las bacterias se realizó siguiendo la metodología de enriquecimiento por Manogaran et al. (2017), utilizando medio salino mineral 1 (MSM1) suplementado con glifosato o AMPA como única fuente de carbono, medio MSM2 suplementado con glifosato o AMPA como fuente de fósforo y medio LB Miller (de aquí en adelante como LB) como medio rico.

Para el enriquecimiento con glifosato, aproximadamente 15 g de suelo se colocaron en un tubo cónico de 50 ml y se agregaron 30 mL de medio MSM1, MSM2 o LB (según sea el caso) y se agregó glifosato a una concentración inicial de 500 ppm (0.5 g/L) utilizando el producto comercial FAENA (stock 363 mg/mL), el cual se esterilizó por filtración. El cultivo se incubó en rotación en un horno de hibridación a 28°C en la oscuridad por 7 días. Después se realizaron otras cuatro transferencias sucesivas cada 7 días a medio fresco con 1 g/L de glifosato (1000 ppm), 5 g/L de glifosato (5000 ppm), 10 g/L de glifosato (10,000 ppm) y 15 g/L de glifosato (15,000 ppm). Se tomaron 100 uL de cada cultivo enriquecido y se plaqueó en cajas con medio sólido suplementado con glifosato (0.5, 1, 5, 10 y 15 g/L). Para el enriquecimiento con AMPA, 15 g de suelo se agregaron a 30 mL de medio MSM1, MSM2 o LB para el enriquecimiento de bacterias degradadoras usando 0.05 g/L de AMPA (50 ppm). El cultivo se incubó en rotación en un horno de hibridación a 28°C en la oscuridad por 7 días. Se realizó una transferencia de 5 mL del cultivo a medio fresco con 0.1 g/L de AMPA (100 ppm) y se incubó a 28°C por 7 días. Después se realizó una última transferencia a medio fresco con 0.5 g/L AMPA (500 ppm) incubando a 28°C por 7 días. Se tomaron 100 uL del cultivo enriquecido y se plaqueó en cajas con medio sólido suplementado con AMPA (0.1 y 0.5 g/L).

Las colonias resultantes de los enriquecimientos se estriaron en medio sólido LB suplementado con 1000 ppm de glifosato o 100 ppm de AMPA para su purificación a través de la técnica de estriado de colonia individual, donde este proceso se repitió 4 veces para asegurar la pureza del aislado bacteriano. Los aislados resultantes se conservaron con glicerol al 30% almacenados a una temperatura de -70°C para conformar un cepario, mientras que para los ensayos las cepas se activaron a partir de los gliceroles en LB con 1000 ppm de glifosato o 100 ppm de AMPA.

Tinción de Gram y pruebas bioquímicas de los aislados bacterianos.

Las cepas bacterianas aisladas se caracterizaron por tinción de Gram, y las pruebas bioquímicas de actividad catalasa, oxidasa, ureasa, hidrólisis de almidón, reducción de nitrato, utilización de citrato, producción de indol y uso azúcares como glucosa, arabinosa y maltosa de acuerdo a métodos establecidos (Schaad 1988).

Extracción de ADN genómico.

El ADN genómico de los aislados se realizó siguiendo la metodología de Wilson et al. (2001) con modificaciones. Brevemente, se colectaron 1.5 mL de un cultivo fresco de la cepa de interés, el botón celular se resuspendió en 562 µl de buffer TE, se agregaron 5 uL de lisozima (25 gm/mL), mezclar bien e incubó 1 h a 37°C. Posteriormente se adicionaron 30 µl de SDS al 10%, se agregaron 3 uL de proteinasa K (20 mg/mL) e incubó 1 h a 37°C. Se agregaron 100 µl de NaCl 5 M y se mezcló perfectamente por inversión. Se agregaron 80 µl de solución 10% CTAB en 0.7 M NaCl, se mezcló completamente e incubó 10 min a 65°C. Se adicionó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se vortexó y centrifugó a 13000 rpm 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo de microcentrífuga nuevo y se le hizo una extracción con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), agitando en vortex y centrifugando durante 5 min a 13000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y el ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 a -20°C toda la noche. Posteriormente, el tubo se centrifugó 10 min a 13000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el ADN se lavó con 1 mL de etanol al 70% centrifugando 5 min a 13000 rpm. El ADN precipitado se dejó secar a temperatura ambiente, se resuspendió en 400 uL de buffer TE, se agregaron 2 uL de RNAsa e incubó a 37°C por 30 min. Se hizo una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 centrifugando en las condiciones antes mencionadas. El ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol al 100% incubando a -20°C por 1 h. Se centrifugó 10 min a 13000 rpm y se hizo un lavado con 1 mL de etanol al 70%. Se removió el sobrenadante y el ADN se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió el ADN en 50 µl de buffer TE o agua ultrapura. La pureza e integridad del ADN se verificó por espectrofotometría y electroforesis.

Amplificación del gen RNAr 16S y genes phn.

La amplificación de la región conservada del gen 16S rRNA se realizará con los oligonucleótidos universales 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') reportados por Melnicakova et al. (2013) para amplificar un producto de aproximadamente 1500 pb. La amplificación del 16S rRNA de cada cepa bacteriana se realizó con el kit GoTaq PCR, se verificó en un gel de agarosa al 1% y los productos de PCR se purificaron con el kit PureLink™ PCR Purification Kit Invitrogen para su envío a secuenciación en Langebio CINVESTAV. Las secuencias obtenidas se analizaron por BLAST en la base del NCBI para identificar secuencias muy similares en las bases de datos. Para el análisis filogenético, se descargaron secuencias del gen 16S rRNA de representantes de los diferentes grupos bacterianos y se analizaron en conjunto con las secuencias obtenidas de cada cepa en el programa Mega X. El alineamiento múltiple se realizó con MUSCLE y se construyó un árbol filogenético por Neighbor Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas, todo en Mega X.

Para la amplificación de los genes *phn*, inicialmente se tenía contemplado amplificar los 5 genes *phnGHIJK*, los cuales forman un complejo con actividad C-P liasa; sin embargo, debido al número de cepas aisladas se decidió solamente amplificar el gen *phnJ*, el cual se sabe es la unidad catalítica del complejo C-P liasa (Joshimsen et al. 2011), y los genes *phnG* y *phnH*, los cuales se han utilizado para analizar muestras ambientales (Mauffrey et al. 2017). Para ello, se seleccionaron los iniciadores *phnJ* F1 (5'-CST ATC TSG ACG ARC AGA CSA A-3') y *phnJ* R2 (5'-TCG TCG GMG CCC TGR TCG A-3') reportados por Morales et al. (2020) que amplifican un producto de PCR de 198 pb; para *phnG*, los iniciadores *PhnGf* (5'-ATGATGGACGCAGCGAAGACAAGTGACGATG-3') y *PhnGr* (5'-ATCCTCTCCGCGGACCATGGTG-3') que amplifican un producto de 447 pb; para *phnH*, los iniciadores *PhnHf* (5'-

ATGACCGCCCAATCGCAAATCTATAGCGGC-3') y PhnHr (5'-CTCCCGCTCGAGTTTGGTGGTGC-3') que amplifican un producto de 577 pb (Parker et al. 1999).

Ensayos de tolerancia en medio sólido.

Para los ensayos de tolerancia, se realizaron ensayos en placas de medio sólido MSM1, MSM2 o LB con concentraciones crecientes de glifosato (1000, 5000, 10000 y 15000 ppm) y AMPA (100 y 500 ppm) para determinar aquellas cepas más tolerantes al glifosato y AMPA. Para ello, las cepas se crecieron en LB suplementado con 1000 ppm de glifosato o 100 ppm de AMPA por 24 h a 28°C en agitación. Se transfirió 1 mL del cultivo a un microtubo, se centrifugó a 6000 x g por 5 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El pellet de células se lavó 3 veces con 1 mL de solución salina al 0.85% NaCl y se resuspendieron las células por vortexeo para lavarlas. Se centrifugó nuevamente a 6000 x g por 5 min a 4°C para eliminar el sobrenadante. De los cultivos lavados, se tomaron 20 uL y se depositó en forma de gota sobre cajas con medio LB, MSM1 o MSM2 a las concentraciones de 1000, 5000, 10000 y 15000 ppm de glifosato, y 100 y 500 ppm de AMPA. Se dejaron secar y se incubaron a 28°C por 3 días para registrar su crecimiento.

Ensayo de remoción de glifosato en cultivo líquido y cuantificación por ELISA.

Las cepas seleccionadas se sembraron en 5 mL de medio LB con glifosato 1000 ppm (FPS-16, FPS-22, CR-Gli-09, CR-Gli-10) o AMPA 100 ppm (FPS-AMP-05, FPS-AMP-08, CR-AMP-07, CR-AMP-10) y se incubaron a 28°C en agitación por 24 h. El cultivo celular se centrifugó a 6000 rpm 5 min para obtener el pellet. Este pellet se lavó 3 veces con solución salina al 0.85% de NaCl, agregando 1 mL de la solución y vortexeando hasta resuspender, para centrifugar a 6000 rpm 5 min y descartando el sobrenadante. El pellet lavado se resuspendió en 1.5 mL para utilizar 1 mL para medir DO600 y el resto para inocular. La cantidad de inóculo se calculó basado en que un cultivo con una DO600 de 2.0 se inocularon 50 uL en 5 mL de medio MSM1 suplementado con 1000 ppm de glifosato de cada cepa en el caso de los cultivos mixtos, y 100 uL de inóculo para los cultivos puros (monocultivos). Para los ensayos de remoción, se incluyeron como tratamientos la cepa degradadora de glifosato y una de AMPA (cultivos mixtos), y los respectivos controles (monocultivos) como se observa en la siguiente tabla:

Tratamientos para ensayo de remoción de glifosato *in vitro*.

Cepas FPS	Cepas CR
<ul style="list-style-type: none"> • FPS-16 • FPS-22 • FPS-AMP-08 • FPS-AMP-05 • FPS-16 X FPS-AMP-05 • FPS-16 X FPS-AMP-08 • FPS-22 X FPS-AMP-05 • FPS-22 X FPS-AMP-08 • Control glifosato 	<ul style="list-style-type: none"> • CR-Gli-09 • CR-Gli-10 • CR-AMP-07 • CR-AMP-10 • CR-Gli-09 X CR-AMP-07 • CR-Gli-09 X CR-AMP-10 • CR-Gli-10 X CR-AMP-07 • CR-Gli-10 X CR-AMP-10 • Control glifosato

Los cultivos se realizaron en tubos cónicos de 50 mL y se incubaron por 7 días a 28°C en agitación. Para la toma de muestra, se tomaron 1.5 mL del cultivo, se centrifugó a 13000 rpm por 5 min, se colectó el sobrenadante y se dividió en dos alícuotas: una de 1 mL que se almacenó a -20°C y una de 0.5 mL almacenada a 4°C para su análisis por ELISA dentro de los 7 días de colecta.

A la fecha se han realizado 2 experimentos, los cuales no se han hecho por triplicado ya que se realizaron para estandarizar el ensayo de remoción y la técnica de ELISA ya que el número de placas con que disponemos es solamente de 4 debido a su alto costo. Sin embargo, considerando los resultados, se procederá a realizar el ensayo final por triplicado cada tratamiento para que pueda analizarse de manera estadística.

La concentración de glifosato se determinó utilizando el kit Abraxis Glyphosate Plate Assay Kit (96T) PN 500086, el cual es un método colorimétrico tipo ELISA que permite cuantificar la presencia de glifosato en un rango de 0.13-4 $\mu\text{g/L}$ con un límite de detección de 0.05 $\mu\text{g/L}$ en agua. Se incluyó un control de agua destilada utilizada para las diluciones, el kit ya contiene estándares para realizar la curva y un control de calidad (0.75 $\mu\text{g/L}$). Las muestras obtenidas de los ensayos de cepas individuales y cultivos mixtos se diluyeron a 1:1,000,000 para alcanzar los niveles dentro del rango de cuantificación de la curva de calibración. La concentración de glifosato se calculó de acuerdo a las instrucciones del kit. Los niveles de glifosato residual se graficaron como porcentaje relativo al control de medio MSM1 con 1000 ppm de glifosato (como 100%) y la concentración de cada tratamiento.

Montaje del microcosmos (en montaje).

Se colectaron muestras de suelo de 1 kg a una profundidad de hasta 30 cm en zonas libres de glifosato (para ensayo final), para la estandarización se utilizó el suelo remanente de la colección de muestras para el aislamiento. Se eliminaron las rocas y restos vegetales, se dejó secando al aire y se tamizó para lograr un tamaño de partícula >2 mm. El suelo se esterilizó por autoclave 20 min a 121°C al menos 2 veces. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) Suelo + glifosato (100 mg/kg), 2) Suelo + glifosato (100 mg/kg) + Cepa Gli, 3) Suelo + glifosato (100 mg/kg) + Cepa AMPA, y 4) Suelo + glifosato (100 mg/kg) + Consorcio, cada tratamiento por triplicado consistiendo en 30 g de suelo. La selección de la concentración de 100 mg/kg de glifosato se basó en reportes donde se muestran niveles máximos en suelo de Argentina (05 mg/kg) (Peruzzo et al. 2008) mientras que en México se han reportado menos de 1 mg (Salazar-López, 2016). Considerando que las cepas seleccionadas removieron altas concentraciones de glifosato *in vitro*, se decidió usar 100 mg/kg que corresponde a una concentración muy alta y evaluar la eficiencia en la degradación de glifosato.

Para el montaje de los microcosmos, 1.8 kg de suelo se dividió en 4 submuestras de 450 g. Para cada submuestra la humedad se ajustó a 35% con agua destilada mezclando hasta homogenizar. Una vez ajustada la humedad, se agregó la cantidad equivalente de glifosato de 100 mg/kg, se dividió en 15 microcosmos independientes de 30 g cada uno, y se inoculó para los controles de cada cepa con una concentración de 1×10^8 CFU/g, mientras que para los cultivos mixtos se inóculo con 1×10^4 CFU/g de cada cepa. Cada tratamiento considerando las tomas de muestra se hicieron por triplicado. Los experimentos del microcosmos se incubaron a temperatura ambiente (aprox. 28°C) en oscuridad. La humedad del microcosmos se ajustó a lo largo de todo el experimento con agua destilada. La toma de muestras se realizó a los días 0, 7, 14, 28 y 40 días, tomando al azar 3 microcosmos de cada tratamiento. De cada microcosmos muestra se tomaron 25 g de suelo para cuantificación de glifosato y AMPA y se almacenaron a -20°C en oscuridad para su análisis posterior por UPLC-MS, mientras que para la cuantificación bacteriana se tomaron muestras de 3 g de suelo. La cantidad de glifosato y AMPA de las muestras de suelo del microcosmos se cuantificó por UPLC-MS, en el Laboratorio de Plaguicidas del Laboratorio Nacional para Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA-CIAD) en CIAD Coordinación Culiacán. Para la cuantificación bacteriana, 1 g de suelo se resuspendió en 10 mL PBS agitando vigorosamente en un vórtex para desprender las bacterias, se realizaron diluciones seriales y se estimó la abundancia como UFC/g de suelo.

4. GRUPO DE TRABAJO. Descripción de las capacidades científicas, técnicas, de infraestructura y administrativas de los participantes en el proyecto y, de ser el caso, de las instituciones u organizaciones a las

que estén adscritos y su relación con los objetivos planteados en el proyecto.

El Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Coordinación Culiacán cuenta con la infraestructura necesaria para la ejecución del proyecto por parte del laboratorio de Biología Molecular y Genómica Funcional con el equipo para el aislamiento de las bacterias, su caracterización microbiológica, identificación a nivel molecular, la realización de los ensayos *in vitro* y de microcosmos. Cuenta con incubadoras, ultracongeladores, congeladores, autoclave, potenciómetro, campanas de bioseguridad, termocicladores, equipos de electroforesis, etc. Además, como parte de la institución existe el acceso a equipo de laboratorios bajo el resguardo de otros investigadores donde se cuenta con los lectores de placas, espectrofotómetros, y otros equipos útiles en microbiología en el área agrícola.

Por su parte, el proyecto contempla la participación del Laboratorio de Plaguicidas del Laboratorio Nacional para Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIA-CIAD), cuya unidad cuenta con amplia experiencia en la determinación de glifosato y otros agroquímicos en agua, suelos, alimentos y biota utilizando técnicas analíticas de punta incluyendo cromatografía de gases, UPLC-MS/MS, espectrometría de masas con trampa de iones, HPLC con detector de fluorescencia, entre otras. Relacionados con la presente propuesta, este laboratorio ha apoyado y se encuentra apoyando en la determinación de glifosato en muestras de orina de trabajadores agrícolas, en alimentos y en otras matrices ambientales, por lo que se cuenta con la capacidad técnica y científica para el desarrollo del proyecto.

Finalmente, Fundación Produce Sinaloa es un aliado importante de la presente propuesta ya que representa un vínculo directo con el productor agrícola para conocer sus necesidades y establecer proyecto conjuntos. Para el presente proyecto, sus contribuciones son de capacidad científica y técnica en el conocimiento de los suelos, los sitios para los muestreos y el aislamiento de los microorganismos, así como ser el vínculo para difundir los resultados del presente proyecto en la comunidad de agricultores y dar a conocer las posibilidades de biorremediación de suelos contaminados con tecnologías basadas en microorganismos.

Investigadores y estudiantes:

- Laboratorio de Plaguicidas del Laboratorio Nacional para Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIA-CIAD)

M. en C. Pedro Bastidas Bastidas: Profesor Investigador Asociado A, adscrito al Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas del Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria – CIAD, A.C. Unidad Culiacán. Participación en ensayos de aptitud a Nivel Nacional e Internacional en la determinación analítica de residuos de plaguicidas tanto en alimentos como en matrices ambientales (agua, suelo, aire, etc.), validación de métodos para la determinación de contaminantes. Sus capacidades técnicas y científicas serán primordiales para la evaluación de la degradación de glifosato y AMPA por UPLC-MS en los ensayos de microcosmos de suelo y en caso de ser posible de muestras de ensayos de cultivos *in vitro*.

- Fundación Produce Sinaloa

Dra. Mayra Esparza Araiza: doctora en biología molecular de plantas. Ha trabajado ampliamente con bacterias patógenas de plantas, entre ellas realizando estudios moleculares en *Clavibacter michiganensis*. Tiene amplio conocimiento de zonas de cultivo agrícola y suelos, y participa activamente en la vinculación con productores agrícolas a través de Fundación Produce Sinaloa (FPS). Actualmente, el CIAD tiene vigente un convenio general de Colaboración con FPS desde 2018 y tiene una vigencia de 5 años. Asimismo, FPS e investigadores del laboratorio de Biología molecular y Genómica Funcional de CIAD Culiacán ya han establecido vínculos a través de proyectos de colaboración, entre estos últimos el proyecto “Desarrollo de marcadores moleculares de ADN para la detección de cultivares de tomate resistentes a patógenos” teniendo como responsable técnico a la Dra. Josefina León, y la Dra. María Claudia Villicaña Torres como colaborador, y por parte de FPS a la Dra. Mayra Esparza Araiza como responsable. Su capacidad técnica y científica en técnicas de aislamiento así como toma de muestras de suelos, así como la vinculación con productores agrícolas y difusión de resultados.

- Laboratorio de Biología molecular y genómica funcional, CIAD Culiacán.

-Dra. María Claudia Villicaña Torres (responsable técnico): Investigador Cátedra CONACYT comisionada en CIAD Culiacán. Realizó sus estudios de maestría en el CIBNOR con la caracterización de bacterias promotoras del crecimiento realizando cultivos mixtos y otras técnicas microbiológicas. Doctorado en genética y ha participado en proyectos relacionados con el aislamiento de bacteriófagos utilizando bacterias fitopatógenas. Tiene amplia experiencia en técnicas moleculares, así como en el aislamiento, caracterización de bacterias de fuentes ambientales y ensayos fisiológicos en cultivos bacterianos puros y mixtos. Ha participado en la coordinación de actividades, supervisión y análisis de resultados y elaboración de informes. Realizó las pruebas bioquímicas de utilización de citrato e hidrólisis de almidón de los aislados de la localidad de Costa Rica.

-Dra. Josefina León Félix: Investigador Titular de CIAD Culiacán y Jefe del Laboratorio de Biología molecular y Genómica Funcional. Ha realizado proyectos relacionados con el aislamiento y caracterización genómica de bacterias patógenas en alimentos y muestras ambientales, y posee amplia experiencia en técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos relacionados con inocuidad alimentaria y enfermedades en plantas. Apoyo técnico en las metodologías de extracción de ADN, amplificación por PCR y análisis filogenético.

-QFB. Héctor Carrillo Yañez: analista técnico enfocado principalmente en el desarrollo e implementación de procedimientos para la identificación de microorganismos patógenos para el ser humano a través de alimentos y medio ambiente. Ha participado ampliamente en proyectos involucrando el aislamiento y la caracterización de bacterias de muestras ambientales. Su participación en el proyecto implicó la supervisión y entrenamiento de estudiantes, cotizaciones y seguimiento administrativos para la adquisición de equipos, materiales y reactivos.

-M. en C. Lucía Margarita Rubí Rangel: es licenciada QFB y M. en C. de CIAD Culiacán, realizando tesis de licenciatura y de maestría con el aislamiento de bacteriófagos que infectan bacterias patógenas de humanos y plantas, actualmente se encuentra como estudiante de doctorado de CIAD, Culiacán. Tiene amplia experiencia en el aislamiento y caracterización de bacterias de muestras ambientales y de alimentos. Participó en el proyecto como colaborador en los muestreos así como en el entrenamiento y supervisión en el aislamiento de las cepas bacterianas degradadoras de glifosato y AMPA. **Adicionalmente, participará en la purificación del ADN genómico para su envío a secuenciación para obtener el genoma de las cepas seleccionadas.**

-Tesis de licenciatura:

Solangel Machado Valdes (activo): participó en el aislamiento de las cepas en medios enriquecidos con glifosato a partir de muestras de suelo obtenidas de Fundación Produce Sinaloa. Ha realizado la purificación de 27 cepas y conservación en glicerol; realización de tinción de Gram; ejecución de las pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa, ureasa, producción de indol, hidrólisis de almidón, utilización de citrato, mientras **se encuentra en proceso la prueba de reducción de nitrato y uso de azúcares**; ha realizado el aislamiento de ADN genómico de los aislados, amplificado por PCR el gen RNAr, enviado a secuenciación quedando en espera de las secuencias para su análisis; **se encuentra pendiente la amplificación por PCR del gen *phnJ* de cada aislado.**

Brenda Kirey Figueroa Iriarte (activo): participó en el aislamiento de las cepas en medios enriquecidos con AMPA a partir de muestras de suelo obtenidas de Fundación Produce Sinaloa. Ha realizado la purificación de 9 cepas y conservación en glicerol; realización de tinción de Gram; ejecución de las pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa, ureasa, producción de indol, hidrólisis de almidón, utilización de citrato, mientras **se encuentra en proceso la prueba de reducción de nitrato y uso de azúcares**; ha realizado el aislamiento de ADN genómico de los aislados, amplificado por PCR el gen RNAr, enviado a secuenciación quedando en espera de las secuencias para su análisis; **se encuentra pendiente la amplificación por PCR del gen *phnJ* de cada aislado.**

Valeria León Medina (activo): ha realizado los ensayos de tolerancia a glifosato en medio sólido para las 64 aislados que conforman el cepario probando la tolerancia a glifosato utilizando medio MSM1 (glifosato como fuente de carbono), MSM2 (glifosato como fuente de fósforo) y LB (medio rico) utilizando concentraciones de

1000, 5000, 10000 y 15000 ppm de glifosato. Actualmente, se encuentra realizando los ensayos de remoción de glifosato *in vitro* para cuantificar por el método de ELISA y determinar las cepas o el consorcio con mayor capacidad de degradación de glifosato y potencialmente su análisis por UPLC-MS.

-Residentes graduados por memoria

Alexandra Yaquelin Guzmán López (finalizado): participó en el aislamiento de las cepas en medios enriquecidos con glifosato a partir de muestras de suelo obtenidas de la localidad de Costa Rica Sinaloa, obteniendo un total de 16 cepas conservadas en gliceroles; se realizó la tinción de Gram; y se realizaron las pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa, ureasa y producción de indol.

Alejandro Payán García (finalizado): participó en el aislamiento de las cepas en medios enriquecidos con AMPA a partir de muestras de suelo obtenidas de la localidad de Costa Rica Sinaloa, obteniendo un total de 12 cepas conservadas en gliceroles; se realizó la tinción de Gram; y se realizaron las pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa, ureasa y producción de indol.

Juan Imanol Castro Valdez (activo): se encuentra participando en la extracción de ADN para la amplificación del gen 16S RNAr y envío a secuenciación de los aislados de la muestra de suelo de Costa Rica (28 aislados); se encuentra pendiente la amplificación por PCR del gen *phnJ* de estos aislados. Realizará la prueba de reducción de nitrato y uso de azúcares de los aislados de Costa Rica. Y finalmente evaluará las cepas y el consorcio seleccionado en el microcosmos de suelo.

5. PRODUCTOS OBTENIDOS. Descripción clara y concisa de los productos comprometidos en el proyecto. Es necesario vincular cada uno de los objetivos específicos con los productos esperados. Se sugiere usar la información en la pregunta 3 y 4 del informe técnico.

Objetivo 1.

Para el objetivo 1, se logró generar un cepario constituido por 64 cepas bacterianas aisladas de muestras de suelo de dos sitios agrícolas (Fundación Produce Sinaloa y agrícola en Sindicatura de Costa Rica), las cuales se aislaron con 3 diferentes medios de enriquecimiento suplementados con glifosato o AMPA a concentraciones crecientes. De las 64 cepas, se obtuvieron 43 cepas que se enriquecieron en presencia de glifosato y 21 cepas que crecieron en medios suplementados con AMPA (ver archivo Cepario Glifosato-Ampa proy316020.xls). Las cepas presentaron diferentes morfologías y pigmentación de colonia, así como perfiles diferentes en cuanto a las pruebas bioquímicas (actividad catalasa, oxidasa, ureasa, producción de indol hidrólisis de almidón, utilización de citrato), encontrándose 25 cepas Gram positivas y 39 cepas Gram negativas, con formas de cocos y bacilos (Ver archivo Pruebas bioq_molecular.xls, Figura 1).

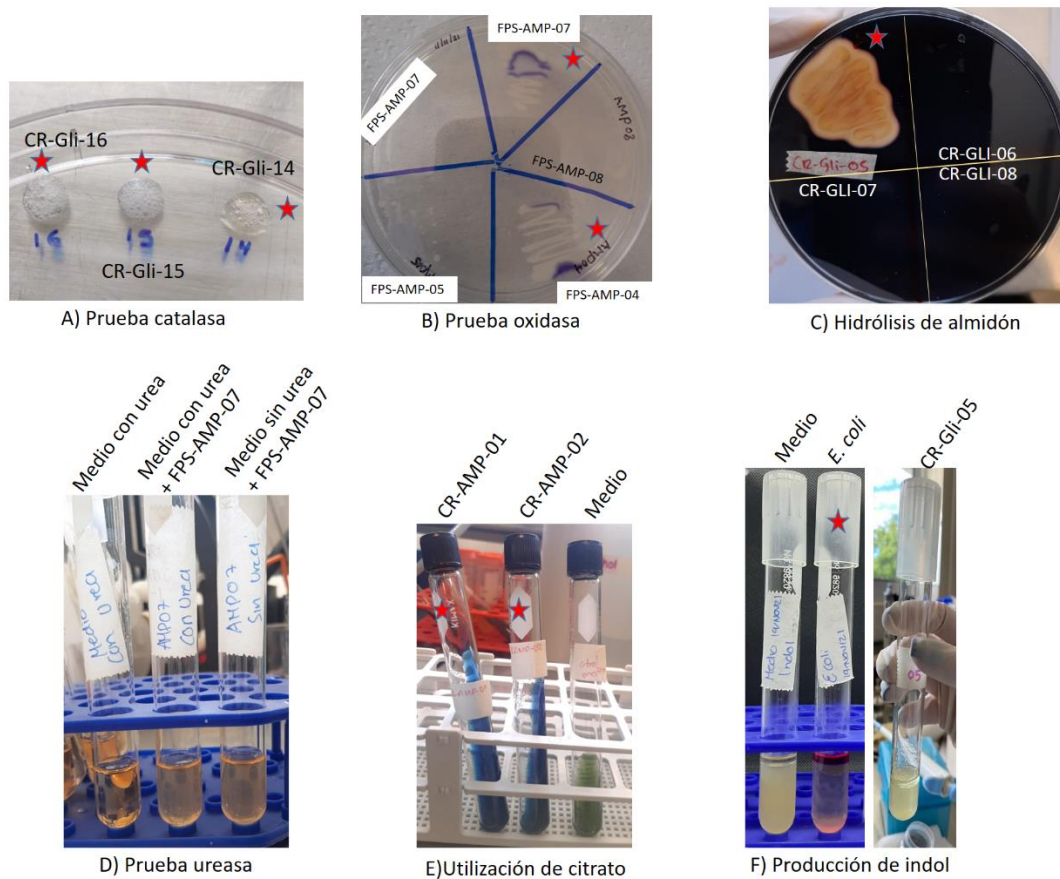


Figura 1. Ejemplos de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas de este proyecto. Lo marcado con una estrella indica respuesta positiva a la prueba.

En cuanto a la caracterización molecular de los genes *phn*, se evaluó por PCR la presencia de *phnG*, *phnH* y *phnJ* utilizando los ADN genómicos de las 12 cepas aisladas con AMPA del sitio de Costa Rica (CR-AMP-01 a CR-AMP-12). Interesantemente, las PCRs mostraron que solo el gen *phnJ* se detectó en varias cepas CR-AMP, aunque produjo fragmentos más grandes (CR-AMP-04 y CR-AMP-08) que pudieran ser inespecíficos (Ver archivo Pruebas bioq_molecular.xls); en el caso del gen *phnG*, la mayoría no amplificaron y algunos produjeron productos de PCR de tamaño diferente que pudieran ser inespecíficos, solo CR-AMP-05 presentó dos bandas de las cuales una de ellas se encuentra en el peso esperado; mientras que para el gen *phnH* no hubo amplificación (Figura 2).

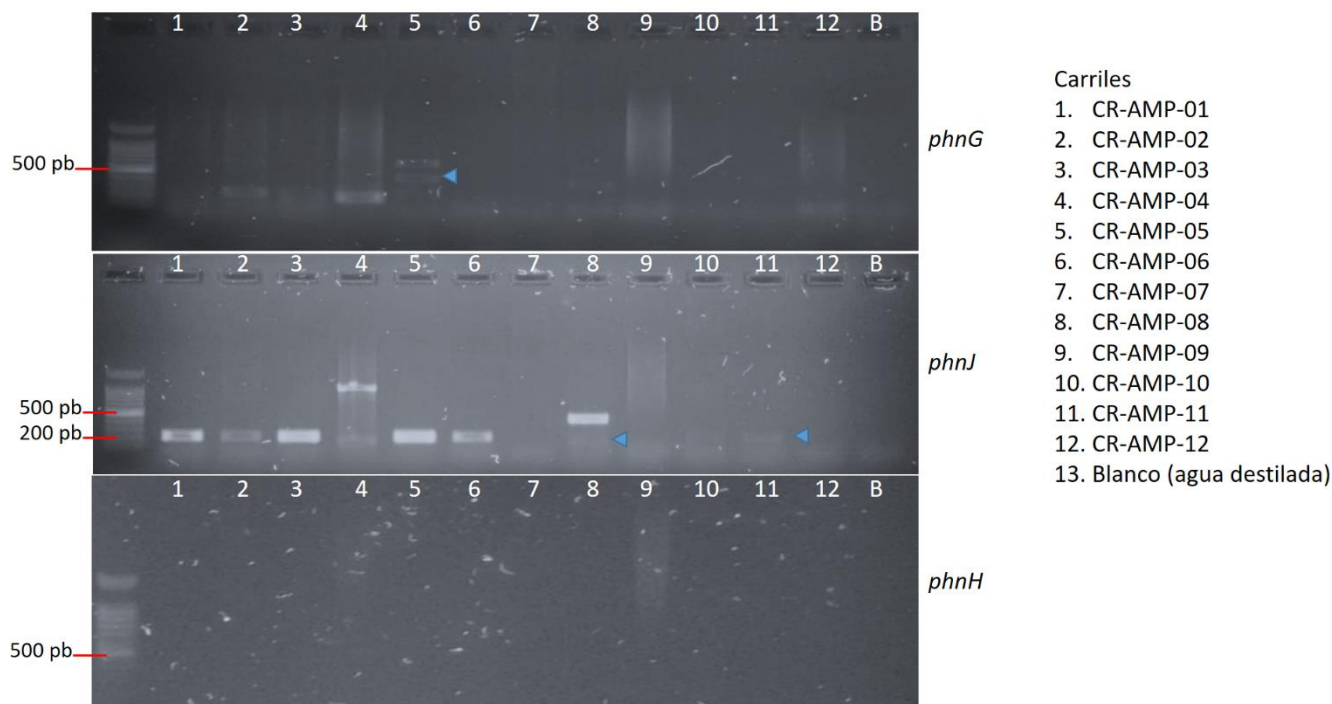


Figura 2. Detección por PCR de los genes *phnG*, *phnJ* y *phnH* en cepas CR-AMP. Los triángulos azules indican los fragmentos con el tamaño esperado: *phnG*, 447 pb; *phnJ*, 198 pb.

Tomando en cuenta estos resultados, nos hace suponer que los iniciadores para los genes *phnG* y *phnH* no están diseñados para detectar estos genes en un amplio rango de bacterias, a pesar de que el estudio de Mauffrey et al. (2017) mostró que estos genes amplificaron para muestras de agua. Por tal, se revisó el trabajo de Parker et al. (1999), donde se diseñaron los iniciadores para estos genes y se observó que los iniciadores se generaron basados solo en la secuencia de *Rhizobium meliloti* indicando que estos iniciadores no se diseñaron a partir de regiones conservadas obtenidas por alineamiento de varias secuencias de diferentes bacterias. Por tal, en conjunto con los ensayos de PCR, se decidió que para las cepas faltantes sólo se analizará la presencia de *phnJ*, donde los iniciadores sí se diseñaron tomando en cuenta secuencias de diversas bacterias (Morales et al. 2020) y dado que este gen se ha descrito como la unidad catalítica del complejo C-P liasa (Joshimsen et al. 2011), se considerará como indicador de la presencia de dicho complejo en las bacterias analizadas.

En cuanto a la amplificación del 16S RNAr, ya se amplificó y se envió a servicio de secuenciación, estando pendiente la entrega y análisis de las secuencias para identificar cada cepa.

Como productos de este objetivo se encuentran:

- Cepario conformado por las cepas degradadoras de glifosato y AMPA bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica Funcional de CIAD Culiacán (Finalizado).

- Lista completa y descripción de las bacterias identificadas con actividad degradadora de glifosato y AMPA (avance 90%). En proceso, las pruebas bioquímicas de reducción de nitrato y uso de azúcares; se completará la detección del gen *phnJ* en las cepas faltantes; la identificación por 16S RNAr, ya se envió el material a secuenciar

y está pendiente la entrega de las secuencias para su análisis e identificar las cepas.

-En cuanto a la formación de recursos humanos: No se logró incorporar un estudiante de maestría y uno de doctorado, como se sugirió en los productos, sin embargo se logró: 1) Incorporación de 2 tesistas de licenciatura involucrados en el aislamiento y caracterización de las bacterias con proyección de titulación a más tardar en junio 2022 (90%); 2) Capacitación de 2 residentes de licenciatura, con lo cual generaron una memoria de residencias que les permitió graduarse bajo la modalidad de titulación integral del Instituto Tecnológico de Culiacán (Finalizado). Con lo cual se cumple con la formación de recursos humanos altamente capacitados.

Objetivo 2.

En este objetivo, se realizaron inicialmente pruebas de tolerancia a glifosato y AMPA en medio sólido como una estrategia para seleccionar del cepario aquellas cepas que presentaran una mayor tolerancia a estos compuestos y, por tanto, representen candidatos para los ensayos de remoción de glifosato *in vitro*. Se observó de manera general que la mayoría de las cepas toleraron sin problema una concentración de glifosato de 1000 ppm (1 g/L) de glifosato y las de AMPA 500 ppm; interesantemente, se logró observar que las cepas pudieron crecer en medio MSM2, donde se utiliza el glifosato como fuente de fósforo, a mayores concentraciones del agroquímico en contraste con el medio MSM1, donde el glifosato se utiliza como fuente de carbono. Esto nos sugiere que las cepas presentan una mayor capacidad de asimilar el glifosato como fuente de fósforo en vez de carbono, y en el caso del AMPA se observó un patrón similar (Ver archivo .xls). De todas las cepas evaluadas, se seleccionaron las cepas FPS-16 y FPS-22 que mostraron tolerancia a concentraciones de 5000 y 10000 ppm de glifosato, respectivamente; las cepas FPS-AMP-05 y FPS-AMP-08, 1000 ppm de glifosato; las cepas CR-AMP-09 y CR-AMP-10, 5000 ppm de glifosato; CR-Gli-09 y CR-Gli-10, hasta 10000 ppm (Figura 3).

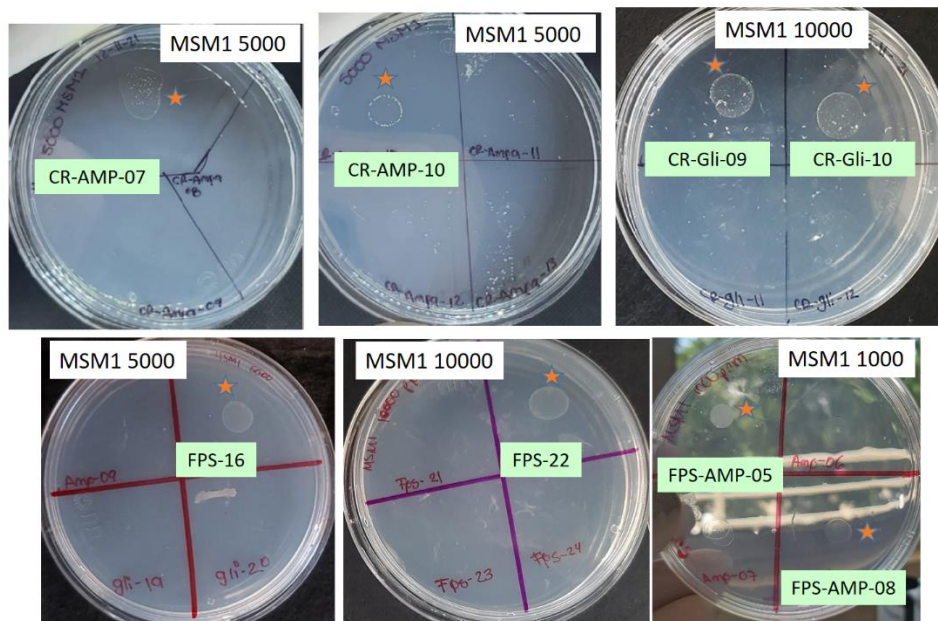


Figura 3. Ejemplo de ensayo de tolerancia en medio sólido, donde se observa el crecimiento de las cepas seleccionadas en medio MSM1 a diferentes concentraciones de glifosato.

Para los ensayos de tolerancia, se incluyeron como tratamientos la cepa degradadora de glifosato y una de AMPA, y los respectivos controles teniendo como tratamientos:

Tratamientos para ensayo de remoción de glifosato *in vitro*.

Cepas FPS	Cepas CR
<ul style="list-style-type: none"> • FPS-16 • FPS-22 • FPS-AMP-08 • FPS-AMP-05 • FPS-16 X FPS-AMP-05 • FPS-16 X FPS-AMP-08 • FPS-22 X FPS-AMP-05 • FPS-22 X FPS-AMP-08 • Control glifosato 	<ul style="list-style-type: none"> • CR-Gli-09 • CR-Gli-10 • CR-AMP-07 • CR-AMP-10 • CR-Gli-09 X CR-AMP-07 • CR-Gli-09 X CR-AMP-10 • CR-Gli-10 X CR-AMP-07 • CR-Gli-10 X CR-AMP-10 • Control glifosato

Como resultado de la cuantificación por ELISA se obtuvo que todas las cepas seleccionadas, excepto la CR-Gli-09 que no se analizó en este ensayo, fueron capaces de eliminar el glifosato en un alto porcentaje mostrando un remanente de aproximadamente 56% de glifosato para FPS-22 y entre 10-30% de glifosato en las cepas restantes. Sin embargo, al analizar los tratamientos en cultivo mixto de las cepas se observó un efecto antagonista en cuanto a la remoción de glifosato ya que el porcentaje de glifosato remanente fue mayor en los cultivos mixtos en comparación con los cultivos puros, observando un efecto muy drástico para las combinaciones de la cepa CR-Gli-10 con CR-AMP-07 y CR-AMP-10 donde se redujo drásticamente la remoción de glifosato (Figura 4). Estos datos resultan relevantes porque nos indican la importancia de las interacciones entre microorganismos, lo cual puede repercutir en la eficiencia de las cepas destinadas para consorcios y de su efectividad cuando son aplicadas en campo, donde la comunidad bacteriana es compleja.

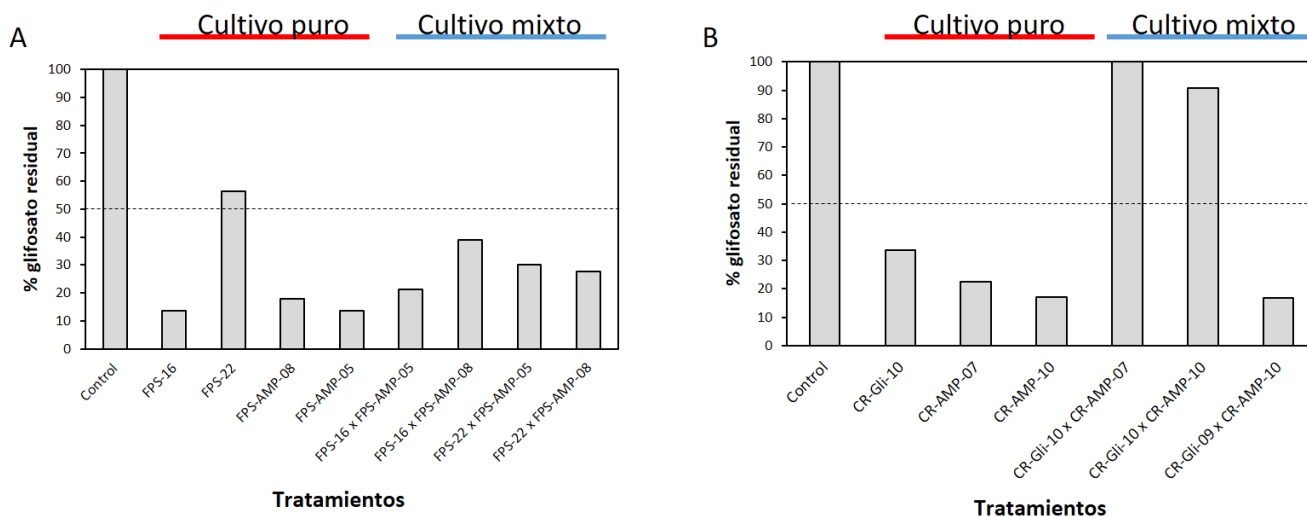


Figura 4. Cuantificación de glifosato residual de ensayos de remoción por ensayo de ELISA. El ensayo consistió de cultivos líquidos de MSM1 suplementado con 1000 ppm de glifosato y dejado en incubación por 7 días. A) Cepas aisladas de Fundación Produce Sinaloa (FPS), y B) Cepas aisladas de Costa Rica (CR).

La cuantificación de acuerdo a la curva estándar proporcionada en el kit de ELISA mostró que para el ensayo con cepas FPS, el control de MSM1 con glifosato presentó una concentración de 4266 ppm de glifosato, mientras que el control de MSM1 con glifosato para el ensayo CR presentó una concentración 6943 ppm de glifosato, presentando ambos ensayos valores muy superiores a lo teórico suplementado de 1000 ppm partiendo de la concentración del glifosato comercial FAENA. No obstante, el porcentaje de glifosato residual se calculó basando la concentración del control de glifosato como 100%, por lo que a pesar de la variación en el valor absoluto de glifosato (debido a variaciones de pipeteo e incluso concentración del producto comercial), el valor relativo es representativo de la remoción de glifosato por parte de las cepas. Interesantemente, de acuerdo al ensayo, las cepas que presentaron el menor porcentaje de glifosato remanente fueron las cepas FPS-16 y FPS-AMP-05 con un 13% aproximadamente. Estos ensayos se repetirán incluyendo la cepa CR-Gli-09 y sus combinaciones para confirmar los resultados obtenidos de este primer ensayo.

Considerando los resultados de remoción de glifosato por ensayo de ELISA, se tiene contemplado confirmar los datos de glifosato remanente obtenidos por ELISA de las cepas con mayor remoción (FPS-16 y FPS-AMP-05) y de su respectivo consorcio por UPLC-MS para validar la confiabilidad del método de ELISA como método cuantitativo y confirmar la capacidad degradadora de las cepas. Por otro lado, también se realizará un ensayo de remoción, pero utilizando AMPA a 500 ppm en cultivo por 7 días para verificar si FPS-16 y FPS-AMP-05 degradan AMPA, demostrando la versatilidad de las cepas donde tienen la capacidad de degradar ambos compuestos. En el caso de las cepas aisladas por enriquecimiento con AMPA se observó que son capaces de degradar el glifosato, indicando que pueden procesar no sólo el AMPA sino el glifosato también, aunque si ambos procesos se deben al complejo C-P liasa o involucran a la glifosato oxidoreductasa (GOX) no se puede inferir, además de que no se han reportado iniciadores específicos para GOX puesto que la información genómica de este gen es muy escasa.

Adicionalmente, a partir de los resultados de ELISA, se enviará a secuenciación el material genético de las cepas que presenten el mayor porcentaje de remoción de glifosato (candidatas posibles FPS-16 y FPS-AMP-05) para conocer las características genómicas de los aislados, lo cual dará la pauta para realizar estudios funcionales y entender a nivel molecular los mecanismos de degradación de glifosato, ya que la información en este sentido es escasa. Este aspecto representa una ventana de oportunidad para realizar estudios genómicos, genéticos y fisiológicos a futuro en esta línea de investigación con el propósito de generar conocimiento básico acerca de los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de degradación de agroquímicos.

Como productos de este objetivo se encuentran:

- Base de datos con los resultados de tolerancia a glifosato y AMPA por parte de las cepas (Finalizado).
- Obtención de la composición del consorcio con mayor actividad de remoción de glifosato in vitro (80%). Este producto viene enlistado como tal en el convenio; sin embargo, a la luz de los presentes resultados, se confirma la actividad degradadora de cepas puras mientras que en los cultivos mixtos se observaron interacciones antagonistas. Estas observaciones implican que el diseño de un consorcio deberá implicar un proceso más exhaustivo de combinaciones de más de dos cepas, lo cual no se abordará en este proyecto. Sin embargo, como perspectiva se tiene aprovechar el cepario generado de este proyecto para evaluar las interacciones entre cepas y su efecto en la remoción de glifosato en futuras investigaciones utilizando un diseño estadístico de Plakett-Burman, el cual se ha reportado para el diseño de consorcios para el tratamiento de aguas residuales (Mazzucotelli et al. 2014). Por otro

lado, independientemente de las relaciones antagonistas de los cultivos mixtos, las cepas como monocultivos, especialmente FPS-16 y FPS-AMP-05 degradaron una alta proporción de glifosato dejando solo un 13% del glifosato total en 7 días, y de ser confirmado por UPLC-MS, estas cepas son fuertes candidatas para procesos de biorremediación. Asimismo, el ensayo por UPLC-MS arrojaría datos acerca si la degradación de glifosato es a través de la producción de AMPA ya que este compuesto también se detecta por la técnica.

-Incorporación de una tesista de licenciatura involucrada en la evaluación de tolerancia y remoción de glifosato en cultivo con proyección de titulación a más tardar en junio 2022 (90%).

Objetivo 3.

A la fecha para este objetivo, se ha realizado la estandarización del tratamiento del suelo, desde el secado, tamizado y pruebas para establecer las condiciones de humedad (entre 35-50%) del ensayo por 7 días. Por otro lado, revisando la literatura, se decidió evaluar la actividad de las cepas y del consorcio a una concentración de 100 mg glifosato/kg de suelo, ya que algunos trabajos han reportado niveles máximos de 5 mg/kg en suelo de Argentina (Peruzzo et al. 2008) mientras que en México se han reportado menos de 1 mg (Salazar-López, 2016). Considerando que las cepas seleccionadas removieron altas concentraciones de glifosato *in vitro*, se decidió usar 100 mg/kg que corresponde a una concentración muy alta y evaluar la eficiencia en la degradación de glifosato. Por tal, al finalizar los datos confirmatorios del ELISA y las cepas que se analicen por UPLC-MS, se procederá al montaje del ensayo de microcosmos.

Productos:

-Validación del consorcio degradador en laboratorio con condiciones ambientales relevantes (ensayo de microcosmos). En proceso, considerando los resultados del ensayo ELISA, en este objetivo el producto a entregar corresponde a la validación de las cepas degradadoras en suelo así como la eficiencia del consorcio que como ya se observó en el ensayo preliminar de ELISA, resultó en interacciones antagonistas para la remoción de glifosato. En este punto, el ensayo de microcosmos validará la eficacia de las cepas y demostrará los efectos antagonistas de interacción, apuntando a la relevancia del diseño cuidadoso de los consorcios para que resulten exitosos en ensayos de campo.

-Capacitación de 1 residente de licenciatura en curso, que generará una memoria de residencias de los ensayos de microcosmos que le permitirá graduarse bajo la modalidad de titulación integral del Tecnológico de Culiacán (20%): incorporado en febrero de 2022 y se encuentra participando en la extracción de ADN genómico, amplificación del gen 16S RNAr y *phnJ*, y caracterización bioquímica faltante de las cepas de Costa Rica (28 aislados).

-Una nota de divulgación asociada al uso de bacterias en la degradación de agrotóxicos como el glifosato en la restauración de suelos (Finalizado).

-Adicional: Una nota de divulgación asociada al uso de bacterias en la degradación de agrotóxicos como el glifosato en la restauración de suelos (Finalizado).

-Escritura de un manuscrito de investigación para enviarse a revisión a una revista internacional con JCR (Avance 50%).

6. BENEFICIOS, RESULTADOS Y USUARIOS FINALES. Se deberá indicar las ventajas, consecuencias positivas e impacto del proyecto y cuáles fueron los mecanismos de transferencia de resultados y/o usuarios finales.

Los resultados del presente proyecto son:

- Generación de un cepario que se encuentra bajo resguardo en el laboratorio de Biología molecular y genómica funcional del CIAD Culiacán (finalizado).
- Se generó una lista completa con descripción de las bacterias identificadas (morfológica, bioquímica y molecularmente) con actividad degradadora de glifosato y AMPA (90%).
- Se generó una base de datos con los resultados de tolerancia a glifosato y AMPA por parte de las cepas (Finalizado).
- Se demostró la capacidad degradadora de glifosato de las cepas seleccionadas por ensayo *in vitro*, e interesantemente se revelaron interacciones antagonistas en los consorcios bacterianos sintéticos, sugiriendo que se deben abordar otras metodologías para el diseño de un consorcio funcional, aunque las cepas individuales presentaron una actividad de remoción considerable por lo que son candidatas para proceso de biorremediación (80%).
- En proceso: Se demostrará la actividad de las cepas seleccionadas, así como de su respectivo consorcio en condiciones ambientales relevantes por ensayo de microcosmos de suelo proporcionando evidencia para mejorar el diseño de un consorcio o monocultivo que pueda utilizarse en biorremediación de suelo (40%).
- Se tiene material para 3 tesis de licenciatura proyectado para titularse a más tardar en junio 2022 (90%).
- Se capacitaron 3 residentes de nivel licenciatura en técnicas microbiológicas de aislamiento y caracterización de cepas bacterianas, caracterización molecular y ensayo de microcosmos (2 finalizados y uno en proceso con un 20%).
- Se tiene un avance en la escritura de un manuscrito de investigación para enviarse a revisión a una revista internacional con JCR con los resultados obtenidos del proyecto (50%).
- Se publicó una nota de divulgación titulada “Degradación microbiana del glifosato y sus derivados: una estrategia para la biorremediación de suelos contaminados” asociada al uso de bacterias en la degradación de agrotóxicos como el glifosato y AMPA en la restauración de suelos para su difusión a la comunidad académica y público en general (100%). <https://www.ciad.mx/notas/item/2630-degradacion-microbiana-del-glifosato-y-sus-derivados-una-estrategia-para-la-biorremediacion-de-suelos-contaminados>
- Se publicó un artículo de divulgación en la revista El Jornalero titulado “Bacterias degradadoras de glifosato y el diseño de consorcios como estrategia en la biorremediación de suelo” con el potencial de difundirlos entre los productores agrícolas y despertar el interés por parte de las comunidades agrícolas en el uso de esta tecnología basada en agentes biológicos como una alternativa para la biorremediación de suelos contaminados (100%). https://issuu.com/eljornalero/docs/ed110_1_?fr=sODIzNzIyOTEwOTU

De estos resultados, la generación de un cepario constituido por cepas identificadas y caracterizadas por su potencial degradador de glifosato y AMPA representando un avance significativo ya que se contará con un recurso biológico para el diseño de otros consorcios que potencialmente puedan utilizarse para la remoción de glifosato y AMPA en suelo, plantas y otras fuentes con contaminación, así como analizar en otros aspectos las cepas tales como enfoques fisiológicos, bioquímicos y genómicos. Por otro lado, la demostración de la actividad degradadora de las cepas aisladas constituye la prueba experimental del concepto que a futuro será sujeta de evaluación en campo para evaluar su efectividad en condiciones ambientales relevantes. Relevantemente, la observación de interacciones antagonistas entre las cepas aisladas marca la pauta para considerar factores

importantes tales como las interacciones entre microorganismos para el diseño de un consorcio así como otras estrategias más exhaustivas para obtener un consorcio bacteriano sintético funcional. A futuro, el desarrollo de una tecnología basada en microorganismos serán la base para la generación de un producto biotecnológico con aplicaciones en el área agrícola beneficiando a los productores al reducir el impacto de los agrotóxicos en los suelos y la potencial contaminación de agua y alimentos, así como la reducción de la toxicidad por exposición de los trabajadores agrícolas.

Por otro lado, la ejecución del proyecto ha tenido un impacto importante en la generación de recursos humanos altamente especializados ya que ha proporcionado los espacios, la capacitación técnica y científica para el desarrollo del proyecto y con ello la generación del material necesario para la capacitación y titulación de 3 tesis y 3 residentes de licenciatura, despertando el interés en investigación en ciencia básica y aplicada con la posible captación de dos de las tesis para su ingreso a maestría (comunicación personal) con lo cual se contribuye al fomento de las vocaciones científicas. Por otro lado, en la comunidad científica se está contribuyendo con la generación de una colección de recursos biológicos bien caracterizados así como el establecimiento de la línea de investigación en camino hacia su consolidación en el grupo de investigación en el campo de la biorremediación de suelos, además de proporcionar conocimiento acerca de los procesos de remoción de glifosato por métodos analíticos y develar factores importantes en el diseño de consorcios microbianos factibles para su uso en la remoción de xenobióticos y otros compuestos tóxicos.

Se estima que los usuarios finales de dichas tecnologías serán los productores agrícolas, así como miembros de instituciones interesados en programas de restauración de suelos y ecosistemas contaminados con agrotóxicos. No obstante, el alcance del presente proyecto involucró abordar los aspectos de ciencia básica que va desde el aislamiento y caracterización de las cepas con actividad degradadora de glifosato y AMPA y los ensayos funcionales para determinar la actividad de un consorcio bacteriano sintético; asimismo, este proyecto se enmarcó en otras actividades tales como dar a conocer alternativas a los productores agrícolas para la biorremediación de suelos, reducir los riesgos de toxicidad y contaminación de los suelos y otras fuentes como alimentos, agua, animales y sus efectos en la salud, todo ello demostrado con evidencia científica y difundiendo de esta manera soluciones basadas en la vinculación de instituciones de investigación y la comunidad de agricultores. Entre los mecanismos de transferencia, se difundió una nota de divulgación dirigida al público así como un artículo en la revista El Jornalero para dar a conocer el uso de microorganismos como agentes potenciales en procesos de biorremediación. Asimismo, se espera que los resultados del proyecto se logren difundir a través de la publicación de un artículo científico arbitrado, así como seminarios académicos y abiertos al público; e importantemente, a través de Fundación Produce Sinaloa se buscará llegar a los productores para dar a conocer esta tecnología a través de eventos públicos (Expo Agro 2022), y se buscará financiamiento para una propuesta de continuidad del proyecto con el propósito de evaluar un diseño estadístico para el desarrollo de un consorcio funcional en la remoción de glifosato teniendo como base el cepario generado del presente proyecto y su evaluación en suelo o en campo.

La formulación de un consorcio bacteriano sintético y la demostración de su efectividad en la remoción de glifosato y AMPA en modelos de suelo serán la evidencia base que darán la pauta para evaluar la efectividad del consorcio en estudios de campo, parámetros de aplicación, y a futuro, el diseño y licenciamiento de un producto biotecnológico, para lo cual es importante la colaboración de la comunidad de productores agrícolas quienes constituyen uno de los grupos que serán beneficiados, y articular los beneficios a través de instituciones de gobierno y la comunidad agrícola.

7. PROBLEMÁTICAS Y DIFICULTADES ENCONTRADAS DURANTE EL DESARROLLO DEL PROYECTO. Describa brevemente los principales retos y dificultades científicas, tecnológicas, de infraestructura, sociales, culturales, etc. a las cuales se enfrentó durante el desarrollo del proyecto y que pudieron afectar su logro.

Debido a la pandemia, ha habido un retraso considerable en la entrega de diversos materiales y equipos; sin embargo, el mayor retraso ocurrió en enero de 2022 donde no fue posible retomar las actividades presenciales

después de las vacaciones de diciembre ya que se presentaron brotes recurrentes de COVID-19 entre los miembros del laboratorio, reanudando actividades hasta el 1 de febrero de 2022. Estos acontecimientos implican un retraso de un mes de trabajo y se refleja en los resultados que se encuentran pendientes, las cuales se abordarán en los meses siguientes. En cuanto a los retrasos de los materiales, las pruebas bioquímicas faltantes de reducción de nitrato y uso de azúcares no se han realizado debido a que no han llegado y no hemos logrado conseguir dos reactivos necesarios para su montaje, pero nos comprometemos a realizarlas en el mes siguiente.

Por otro lado, con respecto al ensayo de microcosmos, solo se ha empezado a estandarizar el montaje y no se ha realizado dado que los tratamientos dependen de los resultados del objetivo 2, de los cuales tenemos resultados parciales y de acuerdo a los resultados definitivos que obtengamos se decidirán los tratamientos a montar en microcosmos. Interesantemente, los resultados obtenidos hasta ahora en el objetivo 2, nos indican que las cepas seleccionadas pueden reducir los niveles de glifosato en cultivo *in vitro*, pero en cultivos mixtos indican una relación antagonista. Esto resulta relevante dado que sugiere que de no encontrar una combinación adecuada de las cepas para conformar un consorcio se tendrá que abordar una metodología donde se pueda evaluar un mayor número de combinaciones de más de una cepa para encontrar un consorcio óptimo en proyectos futuros.

8. VINCULACIÓN Y ARTICULACIÓN AL IMPLEMENTAR EL MODELO PENTAHÉLICE (Gobierno-Academia-Industria-Sociedad-Ambiente). Describa brevemente su experiencia general sobre las vinculaciones realizadas o logradas durante el desarrollo del proyecto.

El presente proyecto se encuentra dentro de los primeros niveles de madurez tecnológico ya que involucra principalmente el aislamiento de las bacterias degradadoras y la prueba del concepto todo a nivel laboratorio. El desarrollo del presente proyecto principalmente ha articulado actores de la **Academia**, tales como el grupo de investigación incluyendo investigadores y estudiantes, con el sector **Sociedad** a través de la vinculación con Fundación Produce Sinaloa como representante de la población objetivo como productores agrícolas con el objetivo de desarrollar el presente proyecto y difundir sus principales logros a través de sus espacios y medios de comunicación (notas, artículos) proporcionando alternativas para mitigar el problema de contaminación de suelos con agroquímicos. Fundación Produce además de ser una asociación civil conformada por productores agrícolas, es una organización que participa en acciones en materia de investigación, validación y transferencia de tecnología, por lo que a futuro puede vincular un prototipo tecnológico para biorremediación hacia otros sectores incluidos la **Industria** y el **Gobierno**, para favorecer el desarrollo del prototipo biotecnológico a niveles superiores de escala piloto e incluso a escala industrial en caso de ser exitoso, mientras que por parte del gobierno puede articular dichos desarrollos para establecer estrategias para reducir el impacto del glifosato en los suelos y con ello a la salud de los seres vivos vinculando finalmente con el sector **Ambiente**. Dado el nivel de desarrollo del presente proyecto, el conocimiento generado permitirá validar el concepto, lo cual representa la generación del conocimiento básico para el diseño de un prototipo de consorcio o cepa bacteriana funcional que permita restaurar suelos altamente contaminados con glifosato para el desarrollo de un desarrollo tecnológico, con la perspectiva de desarrollar un producto biotecnológico que pueda validarse para su comercialización.

9. FINANCIAMIENTO SOLICITADO Y EJERCIDO. Presupuesto total solicitado y ejercido para el desarrollo del proyecto y su justificación, infraestructura disponible y la nueva requerida (explicando las razones para su adquisición), así como posibles fondos complementarios.

Se solicitó un presupuesto total de \$1,120,000.00 MXN, del cual se ejercieron \$1,102,149.38 MXN como sigue:

Tipo de gasto:	Gasto corriente	
Descripción	Monto solicitado al fondo	Justificación
Becas	\$45,000.00	Beca por 3 meses (\$5,000.00 MXN) para 3 tesistas de licenciatura que abordarán los objetivos del proyecto.
Gasto Auditoria informe Financiero	\$11,000.00	Gastos de la Auditoría final para el informe técnico del proyecto
Gastos de Trabajo de campo	\$3,000.00	Gastos de transporte para la toma de muestras de suelos para el aislamiento y el ensayo de microcosmos.
Reactivos e insumos	\$677,099.00	Compra de reactivos y consumibles, polimerasa para PCR, kit Elisa para detección de glifosato (precio unitario \$19,000.000 MXN, estimadas 4 placas), frascos, puntas, microtubos, medios de cultivos, glifosato, guantes, reactivos y accesorios para análisis por espectrometría de masas.
Servicios externos especializados	\$79,411.50	1) Secuenciación de fragmentos por Sanger para identificación de las bacterias degradadoras de glifosato y AMPA; secuenciación de DNA genómico de las bacterias seleccionadas.
Tipo de gasto:	Gasto de inversión	
Equipo y accesorios laboratorio	\$286,638.88	Compra de un microscopio binocular compuesto para la observación de la morfología bacteriana; compra de un agitador orbital para crecimiento bacteriano y ensayos de remoción in vitro.
TOTAL	\$1,102,149.38	

El laboratorio de Biología Molecular y Genómica Funcional del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Coordinación Culiacán cuenta con la infraestructura necesaria referente a microbiología y biología molecular para la ejecución del proyecto por parte, contando con equipo para el aislamiento de las bacterias, su caracterización microbiológica, identificación a nivel molecular, la realización de los ensayos *in vitro* y de microcosmos. Cuenta con incubadoras, ultracongeladores, congeladores, autoclave, potenciómetro, campanas de bioseguridad, termocicladores, equipos de electroforesis, etc. No obstante, el laboratorio cuenta con incubadoras, pero no con un agitador ni un microscopio óptico, por lo que la adquisición de ambos equipos fortalecieron las capacidades de análisis y desarrollo de proyectos enfocados en el área de microbiología.

10. REFERENCIAS.

- Arellano-Aguilar, O., Betancourt-Lozano, M., Aguilar-Zárate, G., & de Leon-Hill, C. P. (2017). Agrochemical loading in drains and rivers and its connection with pollution in coastal lagoons of the Mexican Pacific. *Environmental monitoring and assessment*, 189(6), 270.
- Cota-Álvarez, A. J. (2021). Diseño de metagenómica funcional de consorcios microbianos tolerantes a glifosato, carbofurán, permetrina y clorpirifós. [Tesis de Maestría, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, unidad Sinaloa] <http://www.cienciasinaloa.ipn.mx:80/jspui/handle/123456789/312>
- Fan, J., Yang, G., Zhao, H., Shi, G., Geng, Y., Hou, T., & Tao, K. (2012). Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. *The Journal of general and applied microbiology*, 58(4), 263–271.
- Hernández, J. G., Morales, J. B. L., Rodríguez, I. E. M., Ochoa, M. I. H., Madrid, M. L. A., García, A. E. R., Lozano, M. B., Herrera, N. E. P., & Ríos, J. H. P. (2018) ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN SOBRE PLAGUICIDAS EN MÉXICO. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(0), 29-60. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.esp01.03>
- Jochimsen, B., Lolle, S., McSorley, F. R., Nabi, M., Stougaard, J., Zechel, D. L., & Hove-Jensen, B. (2011). Five phosphonate operon gene products as components of a multi-subunit complex of the carbon-phosphorus lyase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(28), 11393–11398.
- Leyva Morales, J. B., García De La Parra, L. M., Bastidas Bastidas, P. de J., Astorga Rodríguez, J. E., Bejarano Trujillo, J., Cruz Hernández, A., Martínez Rodríguez, I. E., Betancourt Lozano, M. (2014) Uso de plaguicidas en un valle agrícola tecnificado en el noroeste de México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 30(3), 247-261
- Liang, Y., Wei, D., Hu, J., Zhang, J., Liu, Z., Li, A., & Li, R. (2020). Glyphosate and nutrients removal from simulated agricultural runoff in a pilot pyrrhotite constructed wetland. *Water research*, 168, 115154.
- Mamy, L., Barriuso, E., & Gabrielle, B. (2016). Glyphosate fate in soils when arriving in plant residues. *Chemosphere*, 154, 425-433.
- Manogaran, M., Shukor, M. Y., Yasid, N. A., Johari, W. L. W., & Ahmad, S. A. (2017). Isolation and characterisation of glyphosate-degrading bacteria isolated from local soils in Malaysia. *Rendiconti Lincei*, 28(3), 471-479.
- Martínez-Nieto, P., Bernal-Castillo, J., Agudelo-Fonseca, E., & Bernier-López, S. (2012). Tolerancia y degradación del glifosato por bacterias aisladas de suelos con aplicaciones frecuentes de roundup sl®. *Revista Pilquen Sección Agronomía*, 14(12).
- Mauffrey, F., Baccara, P. Y., Gruffaz, C., Vuilleumier, S., & Imfeld, G. (2017). Bacterial community composition and genes for herbicide degradation in a stormwater wetland collecting herbicide runoff. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228(12), 452.
- Melničakova, J., Derdakova, M. & Barak, I. A system to simultaneously detect tick-borne pathogens based on the variability of the 16S ribosomal genes. *Parasites Vectors* 6, 1–12.
- Morales, M. E., Allegrini, M., Basualdo, J., Villamil, M. B., & Zabaloy, M. C. (2020). Primer design to assess bacterial degradation of glyphosate and other phosphonates. *Journal of Microbiological Methods*, 169, 105814.
- Ortiz-Hernandez, M., & Sánchez-Salinas, E. (2010). Biodegradation of the organophosphate pesticide tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agricultural soils in México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 26(1), 27-38.
- Parker, G. F., Higgins, T. P., Hawkes, T., & Robson, R. L. (1999). *Rhizobium* (Sinorhizobium) *meliloti* phn genes: characterization and identification of their protein products. *Journal of Bacteriology*, 181(2), 389–395.
- Peruzzo, P. J., Porta, A. A., & Ronco, A. E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 156(1), 61–66.

- Salazar López, N. J., M. I. Silveira Gramont, F. G. Zuno Floriano, G. Rodríguez, Olibarría, M. Hengel, & M. L. Aldana Madrid. (2016) Dissipation of glyphosate from grapevine soils in Sonora, Mexico. *Terra Latinoamericana* 34: 385-391.
- Schaad (1988) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd edition. APS Press.
- Singh, S., Kumar, V., Gill, J., Datta, S., Singh, S., Dhaka, V., Kapoor, D., Wani, A. B., Dhanjal, D. S., Kumar, M., Harikumar, S. L., & Singh, J. (2020). Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(20), 7519.
- Wilson K. (2001). Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2.