

## **Proyecto 316020: Aislamiento de bacterias degradadoras de glifosato y AMPA: alternativas biológicas para la biorremediación de suelos contaminados.**

### Resumen ejecutivo

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. El volumen de producción de plaguicidas en México para 2017 fue de 59 157 ton y del total de plaguicidas utilizados en la zona noroeste, Sinaloa se aplica cerca del 30%. De estos, 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 efectos documentados 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 tiempo 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.

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 fósforo inorgánico (Pi), de nitrógeno (N) o de carbono (C), o ambos. La degradación de glifosato y otros fosfonatos por las bacterias del suelo se lleva a cabo principalmente por dos vías. La primera es la vía C-P liasa, donde 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), siendo este último el metabolito mayoritario durante la degradación biológica del glifosato. El AMPA presenta un rango de toxicidad similar al del glifosato, por lo tanto, se convierte en la fuente de contaminación secundaria en el medio ambiente. 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. 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.

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 degradadoras de glifosato siendo algunas de ellas objeto para la generación de patentes. Algunos estudios han reportado especies bacterianas como *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Burkholderia gladioli*, *Flavimona soryzihabitans*, *Sulfurifustis*, *Sulfuriferula* y *Thiobacillus* asociadas a la degradación de glifosato. *Bacillus cereus* CB4 se reportó con capacidad de degradar concentraciones hasta de 12 g/L (12,000 ppm) de glifosato en cultivo asociada con la actividad de C-P liasa y de glifosato oxidoreductasa. En México los trabajos relacionados al aislamiento de agentes degradadores de glifosato y AMPA es escasa. Se han aislado e identificado 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 (Ortiz-Pérez et al. 2019). Otro trabajo ha reportado la capacidad de tolerancia a diferentes concentraciones de glifosato, carbofurán, permetrina y clorpirifós de cepas bacterianas y consorcios del género *Bacillus* en suelos agrícolas de Guasave, Sinaloa (Cota-Alvarez 2021). Sin embargo, estos trabajos no evaluaron la remoción de glifosato en suelo ni el diseño de un consorcio efectivo.

Por tal, este proyecto tiene como objetivo general el formular un consorcio bacteriano sintético capaz de degradar el glifosato y su derivado AMPA como una alternativa para la biorremediación de suelos contaminados. Para alcanzar dicho objetivo, en este proyecto se procedió al aislamiento de cepas bacterianas capaces de crecer en medios mínimos MSM1 y MSM2 suplementados con glifosato o AMPA como fuente de carbono o fósforo, respectivamente, así como medio LB que es un medio rico. Se logró generar un cepario constituido por 64 cepas bacterianas aisladas de muestras de suelo de dos sitios agrícolas (Fundación Produce Sinaloa denominadas cepas FPS; y agrícola en Sindicatura de Costa Rica denominadas cepas CR), las cuales se aislaron con los 3 diferentes medios de enriquecimiento suplementados con glifosato (1000, 5000, 10000 y 15000 ppm) y AMPA (100 y 500 ppm). 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, presentando diferentes morfologías y pigmentación de colonia, así como diferentes perfiles en cuanto a las pruebas bioquímicas de 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. Molecularmente, se ha encontrado que varias de estas cepas presentan el gen *phnJ*, el cual codifica para una subunidad catalítica del complejo C-P liasa que participa en la degradación de glifosato. Por otro lado, la identificación de las cepas se realizará analizando la secuencia del gen 16S ribosomal, el cual se encuentra pendiente de análisis. Lo anterior resulta relevante dado que se determinará la diversidad de bacterias asociadas a la degradación de

glifosato y AMPA con la posibilidad de encontrar especies no reportadas asociadas a dicho proceso.

Dado el número de cepas aisladas, se seleccionaron 4 cepas degradadoras de glifosato y 4 cepas degradadoras de AMPA a través de un ensayo de tolerancia a glifosato en medio sólido con el fin de obtener las cepas con mayor tolerancia para ensayos de remoción de glifosato en cultivos *in vitro*. De esta estrategia 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, a 1000 ppm de glifosato; las cepas CR-AMP-07 y CR-AMP-10, a 5000 ppm de glifosato; CR-Gli-09 y CR-Gli-10, hasta 10000 ppm. Ensayos preliminares de remoción de glifosato en cultivo líquido han revelado que las cepas en monocultivo son capaces de degradar el glifosato a una concentración de 1000 ppm en un alto porcentaje por el método de ELISA. La cepa FPS-22 mostró un 56% de glifosato residual en cultivo mientras que las demás cepas mostraron valores entre el 10 al 30% de glifosato residual con respecto al cultivo control, demostrando que presentan actividad degradadora. Sin embargo, los cultivos mixtos conformados por una cepa degradadora de glifosato y una de AMPA reveló inesperadamente un efecto antagonista ya que los valores de glifosato residual fueron más altos en comparación con los monocultivos indicando que la composición es fundamental para el desarrollo de un consorcio funcional donde las interacciones entre la comunidad pueden repercutir en la efectividad en el proceso de remoción. Por otro lado, el ensayo de remoción permitirá seleccionar aquellas cepas y su respectivo consorcio para validar los resultados encontrados *in vitro* y con ello demostrar la efectividad de las cepas en la degradación de glifosato en microcosmos de suelo, lo cual sentará las bases para generar un prototipo para biorremediación de suelos. Los resultados generados del proyecto son fundamentales para 1) demostrar actividad degradadora de las cepas individuales, y 2) revelan factores clave en el diseño de consorcios que son determinantes para su funcionalidad, lo cual sugiere que el determinar la composición de un consorcio deberá implicar un proceso más exhaustivo de combinaciones de más de dos cepas, posiblemente implicando un diseño estadístico, por ejemplo, de Plakett-Burman que se ha reportado para el diseño de consorcios para el tratamiento de aguas residuales (Mazzucotelli et al. 2014), para obtener la composición óptima de un consorcio sintético.

Por otro lado, las aportaciones del presente proyecto se centran en la generación de un cepario constituido por cepas bien caracterizadas con actividad degradadora de glifosato y AMPA que constituyen un punto de partida para estudios fisiológicos, bioquímicos, genómicos y biotecnológicos para entender los procesos asociados a la degradación de glifosato y constituye la materia prima para el desarrollo de nuevos consorcios. Asimismo, la experiencia adquirida con el desarrollo de este proyecto consolida la línea de investigación en el grupo de investigación para el aprovechamiento de recursos naturales para atender a una problemática ambiental, la cual tendrá un impacto significativo en la población objetivo constituida por productores y población expuesta a dichos contaminantes; ha permitido un incremento en la capacidad técnica, científica y de infraestructura del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica Funcional de CIAD Culiacán, en el desarrollo de estrategias para la solución de problemáticas de contaminación pudiendo extenderse a diversos agroquímicos y xenobióticos a través de una plataforma amigable con el ambiente; ha contribuido con la formación de

recursos humanos altamente calificados a través de la incorporación de tesis y residentes de licenciatura; y se espera articular el conocimiento científico generado hacia los sectores productivo y gubernamentales para demostrar la eficiencia y con ello la aceptación de tecnologías basadas en conocimiento científico que aseguren su aplicación.