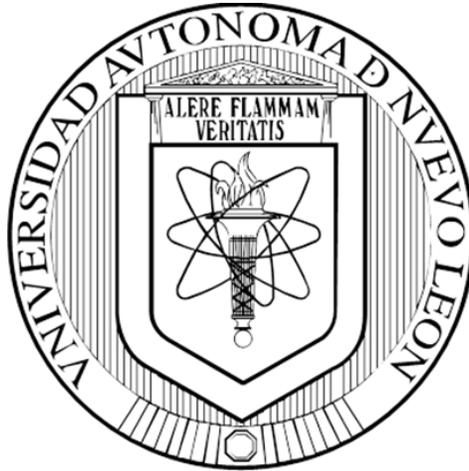


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO POR UN SISTEMA ALTERNATIVO A LA C-P LIASA  
INDEPENDIENTE DE LOS NIVELES DE FOSFATO PRODUCIDO POR *BACILLUS CEREUS*  
6P NATIVA DE NUEVO LEÓN**

**POR**

**LBG. CESAR MARTINEZ LEDEZMA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

**FEBRERO, 2019**

Degradación de glifosato por un sistema alternativo a la C-P liasa independiente de los niveles de fosfato producido por *Bacillus cereus* 6P nativa de Nuevo León

Los miembros del comité de tesis aprueban la tesis realizada por el alumno CESAR MARTINEZ LEDEZMA, con matrícula 1521341, como opción al grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada:

---

**Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu**  
**Presidente**

---

**Dra. Ma. Elena Cantú Cárdenas**  
**Secretario**

---

**Dr. Edgar Allan Blanco Gámez**  
**Vocal**

---

**Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez**  
**Subdirectora de Estudios de Posgrado**

Degradación de glifosato por un sistema alternativo a la C-P liasa independiente de los niveles de fosfato producido por *Bacillus cereus* 6P nativa de Nuevo León

Los miembros para la elaboración de tesis aprueban la tesis realizada por el alumno CESAR MARTINEZ LEDEZMA, con matrícula 1521341, como opción al grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada:

---

**Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu**  
**Director de Tesis**

---

**Dra. María Guadalupe Rojas Verde**  
**Codirector de Tesis**

---

**Dra. Ma. Elena Cantú Cárdenas**  
**Comité Tutorial**

---

**Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio**  
**Comité Tutorial**

---

**Dr. Edgar Allan Blanco Gámez**  
**Comité Tutorial**

## RESUMEN

LBG Cesar Martinez Ledezma.  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de Nuevo León.

Fecha de Graduación:  
Febrero, 2019

Degradación de glifosato por un sistema alternativo a la c-p liasa independiente de los niveles de fosfato producido por *Bacillus cereus* 6P nativa de nuevo león

Número de páginas: 55

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con  
Orientación en Microbiología Aplicada.

Área de Estudio: Microbiología Ambiental Aplicada

**Propósito y Método de Estudio:** Demostrar que la bacteria nativa del Estado de Nuevo León aislada en el Laboratorio de Biotecnología, *Bacillus cereus* 6P es capaz de degradar el herbicida glifosato mediante una enzima distinta a la C-P liasa y de manera independiente a los niveles de fosfato en el ambiente

**Conclusiones y Contribuciones:** La bacteria *B. cereus* 6P es capaz de degradar el glifosato por una vía alternativa a la C-P liasa rompiendo el enlace C-P, realizándolo de manera independiente de los niveles de fósforo en el medio. La enzima encargada de la degradación del glifosato tiene actividad intracelular. Se disminuyen los efectos negativos del glifosato confirmando así su degradación. Con esto, se logra dar un paso más en el estudio de la degradación del glifosato acercándose cada vez más al objetivo de desarrollar un proceso para la remoción de pesticidas organofosforados.

---

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu:

Asesor

“Y todo lo que hagáis, hacedlo de corazón, como para el Señor  
y no para los hombres;”

– Colosenses 3:23

## DEDICATORIA

Al Alfa y Omega, Rey de Reyes, Luz del Mundo, Príncipe de Paz, Consejero Admirable, Cordero de Dios, Salvador del Mundo, Buen Pastor, Seños de Señores, Pan de Vida, Santo y Justo, Mesías, Maestro, Verbo de Dios, a Jesús, Dios Padre y Espíritu Santo.

A mí Madre, Cira Ledezma Vélez, por estar siempre a mi lado y apoyarme en cada momento y cada decisión por más descabellada que fuera.

A mi Padre, Cesar Martínez Rangel, por ser esa ayuda en los momentos más difíciles.

A mi compañera de vida, Veronica Elizondo García, por seguir caminando juntos escribiendo una linda historia.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu mi Asesor de tesis, por su gran apoyo y su guía durante todo el proyecto, sin sus valiosas aportaciones y enseñanzas el presente trabajo no hubiera sido posible y a la Dra. María Guadalupe Rojas Verde, Coasesora de Tesis, por ayudarme a creer en mí y hacerme crecer como investigador y persona.

A mi Comité Tutorial de Tesis, Dra. Ma. Elena Cantú Cárdenas, Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio y Dr. Edgar Allan Blanco Gámez, por sus consejos y aportaciones que me ayudaron a mejorar día a día.

A la Dra. Garima Kaushik y a la M.C. Kritika Sharma por gran apoyo y hospitalidad durante mi estancia de investigación en la India, lo que me permitió aprovechar de la mejor manera mi estadía y adquirir nuevos y valiosos conocimientos.

A la M.C. Alejandra Acosta Cortez, por ser la primera persona en la maestría, que de manera amable y sincera, compartió sus conocimientos en el laboratorio que me permitieron adentrarme en mi investigación y a mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología I y alumnos de Verano Científico, Julio, Yuridia, Patricia, Anaid, Mariela, Jessica, Priscila, Jesús, Joseline y Elva, gracias por su apoyo.

A la técnica del L8 Isela Miroslava Mendoza García, al M.C. Francisco Balderas y al M.C. Alan Pepi por su infinita paciencia y gran conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico para la realización de este proyecto y por permitirme ser parte del convenio México-India del proyecto FONCICYT 266482 y a la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ), de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por darme la oportunidad de realizar mi grado de maestría en sus instalaciones.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	i
DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
TABLA DE CONTENIDO .....	v
ÍNDICE DE TABLAS .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS USADOS .....	ix
<b>CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 INTRODUCCIÓN .....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN .....	3
<b>CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES .....</b>	<b>4</b>
ANTECEDENTES .....	4
<b>CAPÍTULO 3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>7</b>
3.1 HIPÓTESIS .....	7
3.2 OBJETIVO GENERAL .....	7
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	7
<b>CAPÍTULO 4 METODOLOGÍA .....</b>	<b>8</b>
4.1 ANÁLISIS DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE FOSFONATOS Y POLIFOSFATOS .....	8
4.1.1 Análisis bioinformático .....	8
4.1.2 Análisis molecular .....	8
4.2 ENSAYOS IN-VITRO PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD DE METABOLIZAR FOSFONATOS Y POLIFOSFATOS .....	10

4.2.1 Comprobación del método de cuantificación de fosfonatos.....	10
4.2.2 Reactivación y conservación de cepas .....	11
4.2.3 Determinar la capacidad de biodegradar glifosato y acumular polifosfato suministrando glifosato como única fuente de fósforo .....	11
4.2.3.1 Determinación de proteínas totales.....	12
4.2.3.2 Cuantificación de glifosato .....	12
4.2.3.3 Visualización de gránulos de polifosfato .....	13
4.2.4 Determinar la capacidad de biodegradar ácido 2-aminoetil fosfónico (2AEP) y acumular polifosfato suministrando 2AEP como única fuente de fósforo .....	13
4.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE BIODEGRADACIÓN DE GLIFOSATO, SUMINISTRANDO GPn COMO ÚNICA FUENTE DE FÓSFORO .....	14
4.3.1 Determinación del fósforo inorgánico .....	14
4.3.2 Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) .....	14
4.3.3 Visualización del desarrollo de esporas .....	15
4.3.4 Cuantificación de la acumulación de polifosfato .....	15
4.4 INDEPENDENCIA DE BACILLUS CEREUS 6P A LOS NIVELES DE FÓSFORO EN EL AMBIENTE PARA METABOLIZAR EL GLIFOSATO.....	15
4.5 DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE LA POTENCIAL ENZIMA DEGRADADORA .....	16
4.6 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL RESIDUO DE DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO.....	17
4.7 DISPOSICIÓN DE RESIDUOS GENERADOS .....	18
<b>CAPÍTULO 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>19</b>
5.1 ANÁLISIS DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE FOSFONATOS Y POLIFOSFATOS .....	19
5.2 ENSAYOS IN-VITRO PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD DE METABOLIZAR FOSFONATOS Y POLIFOSFATOS .....	24

5.3 PARÁMETROS CINÉTICOS DEL METABOLISMO DEL GLIFOSATO SUMINISTRADO COMO ÚNICA FUENTE DE FÓSFORO POR LA BACTERIA BACILLUS CEREUS 6P .....	32
5.4 INDEPENDENCIA DE BACILLUS CEREUS 6P A LOS NIVELES DE FÓSFORO EN EL AMBIENTE PARA METABOLIZAR EL GLIFOSATO .....	38
5.5 LOCALIZACIÓN DE LA POTENCIAL ENZIMA DEGRADADORA .....	40
5.6 TOXICIDAD DEL RESIDUO DE DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO .....	41
<b>CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES</b> .....	45
CONCLUSIONES .....	45
<b>CAPITULO 7 REFERENCIAS</b> .....	46
REFERENCIAS .....	46
<b>ANEXOS</b> .....	54
Anexo 1: Reactivos utilizados .....	54
Anexo 2: Equipos utilizados .....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PRIMERS UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES <i>PHNJ</i> Y <i>PPK</i> .....	9
TABLA 2. FUENTE DE CARBONO, NITRÓGENO Y FÓSFORO UTILIZADO.....	16
TABLA 3. CONDICIONES DEL BIOENSAYO CON LOMBRICES <i>EISENIA FOETIDA</i> .....	17
TABLA 4. HOMÓLOGOS DEL COMPONENTE CATALÍTICO DE LA C-P LIASA ( <i>PHNJ</i> ), FOSFONOACETALDEHIDO HIDROLASA ( <i>PHNX</i> ) Y LA POLIFOSFATO QUINASA ( <i>PPK</i> ). .....	19
TABLA 5. MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE FOSFONATOS POR LA VÍA DE LA C-P LIASA. MODIFICADA DE KONONOVA Y NESMEYANOVA, (2002) .....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA GENERAL DEL FRACCIONAMIENTO CELULAR REALIZADO AL CULTIVO DE BACILLUS CEREUS. ....	16
FIGURA 2. RUTA METABÓLICA DE DEGRADACIÓN DEL ÁCIDO 2-AMINOETIL FOSFÓNICO EN BACTERIAS (QUINN ET AL., 2007).....	20
FIGURA 3. GEL DE ELECTROFORESIS CORRESPONDIENTE A LA AMPLIFICACIÓN DE PHNJ DE B. CEREUS 6P .....	21
FIGURA 4. RUTA METABÓLICA DE DEGRADACIÓN DEL GLIFOSATO EN BACTERIAS. VÍAS DE DEGRADACIÓN A TRAVÉS DE AMPA Y SARCOSINA. TCC: CICLO DEL ÁCIDO TRICARBOXÍLICO; THC: CICLO DE TETRAHIDROFOLATO; SOM: MATERIA ORGÁNICA DE SUELO (WANG ET AL., 2016). ....	22
FIGURA 5. GEL DE ELECTROFORESIS CORRESPONDIENTE A LA AMPLIFICACIÓN DE PPK DE B. CEREUS 6P	23
FIGURA 6. RUTA METABÓLICA DE LA SÍNTESIS DE POLYP EN BACTERIAS (SHIBA ET AL., 2000). ....	23
FIGURA 7. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DEL GLIFOSATO, AMPA Y 2AEP. REACCIÓN DEDERIVATIZACIÓN CON FMOC-CL. R: H O GRUPO ALQUILO. MODIFICADO DE (IBÁÑEZ ET AL., 2005; KLEPS ET AL., 2007) ...	24
FIGURA 8. ESPECTRO UV-VIS DEL GLIFOSATO DERIVATIZADO CON FMOC-CL A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLIFOSATO DE 0 HASTA 300 MM. EL RECUADRO MUESTRA LA REGRESIÓN EN LÍNEA RECTA OBTENIDA A 295 NM. ....	25
FIGURA 9. ESPECTRO UV-VIS DEL AMPA DERIVATIZADO CON FMOC-CL A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLIFOSATO DE 0 HASTA 300 MM. EL RECUADRO MUESTRA LA REGRESIÓN EN LÍNEA RECTA OBTENIDA A 295 NM. ....	26
FIGURA 10. ESPECTRO UV-VIS DEL 2AEP DERIVATIZADO CON FMOC-CL A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLIFOSATO DE 0 HASTA 300 MM. EL RECUADRO MUESTRA LA REGRESIÓN EN LÍNEA RECTA OBTENIDA A 295 NM. ....	27
FIGURA 11. PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO POR BACTERIAS DE LA FAMILIA BACILLACEAE UTILIZANDO GPN COMO ÚNICA FUENTE DE FÓSFORO. ....	28
FIGURA 12. TINCIÓN DAPI PARA IDENTIFICACIÓN DE POLIFOSFATO EN BACTERIAS DE LA FAMILIA BACILLACEAE UTILIZANDO GLIFOSATO COMO ÚNICA FUENTE DE FÓSFORO. ....	29
FIGURA 13. ACUMULACIÓN DE GRÁNULOS DE POLIFOSFATO EN MMMC CON GLIFOSATO COMO UNICA FUENTE DE FÓSFORO POR BACILLUS CEREUS 6P. OBSERVADO CON TINCIÓN DAPI EN MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA.....	30
FIGURA 14. PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y DEGRADACIÓN DE 2AEP POR BACTERIAS DE LA FAMILIA BACILLACEAE UTILIZANDO 2AEP COMO ÚNICA FUENTE DE FÓSFORO. ....	31
FIGURA 15. TINCIÓN DAPI PARA IDENTIFICACIÓN DE POLIFOSFATO EN BACTERIAS DE LA FAMILIA BACILLACEAE UTILIZANDO 2AEP COMO ÚNICA FUENTE DE FÓSFORO. ....	32

FIGURA 16. CINÉTICA DE BIODEGRADACIÓN DE GLIFOSATO SUMINISTRADO COMO ÚNICA FUENTE DE FÓSFORO LLEVADA A CABO POR LA BACTERIA BACILLUS CEREUS 6P. ....	33
FIGURA 17. UFC DE BACILLUS CEREUS SUMINISTRANDO GPN COMO ÚNICA FUENTE DE FÓSFORO.....	34
FIGURA 18. TINCIÓN VERDE MALAQUITA PARA VISUALIZACIÓN DE ESPORAS, EN CULTIVO DE BACILLUS CEREUS 6P HASTA LAS 168H.....	35
FIGURA 19. TINCIÓN VERDE MALAQUITA PARA VISUALIZACIÓN DE ESPORAS A LAS 72H. GLIFOSATO COMO ÚNICA FUENTE DE FÓSFORO: GPN. $K_2HPO_4$ COMO ÚNICA FUENTE DE FÓSFORO: PI+. SIN FUENTE DE FÓSFORO: PI-.....	36
FIGURA 20. CINÉTICA DE ACUMULACIÓN DE POLIFOSFATO EMPLEANDO GLIFOSATO SUMINISTRADO COMO ÚNICA FUENTE DE FÓSFORO LLEVADA A CABO POR LA BACTERIA BACILLUS CEREUS 6P.....	36
FIGURA 21. CINÉTICA DE BIODEGRADACIÓN DE FENILFOSFONATO Y METILFOSFONATO LLEVADA A CABO POR LA BACTERIA BACILLUS CEREUS 6P.....	37
FIGURA 22. PRODUCCIÓN DE BIOMASA POR B. CEREUS 6P, UTILIZANDO DIFERENTES FUENTES DE FÓSFORO. ....	39
FIGURA 23. LIBERACIÓN DE PI EN LAS DIFERENTES FRACCIONES DEL CULTIVO DE BACILLUS CEREUS 6P A LAS 96 H.....	40
FIGURA 24. CONCENTRACIÓN DE GPN EN LAS DIFERENTES FRACCIONES DEL CULTIVO DE BACILLUS CEREUS 6P A LAS 96 H.....	41
FIGURA 25. INCREMENTO EN PESO DE LOMBRICES CULTIVADAS BAJO 4 CONDICIONES: AGUA (CONTROL), GPN CON GLIFOSATO COMERCIAL 3.38 PPM), GPN DEGRADADO (PRODUCTO DE DEGRADACIÓN DEL GLIFOSATO GRADO REACTIVO), GPN REACTIVO (GLIFOSATO GRADO REACTIVO 3.38 PPM) .....	42
FIGURA 26. NUMERO DE CRÍAS DE LOMBRICES CULTIVADAS BAJO 4 CONDICIONES: AGUA (CONTROL), GPN CON GLIFOSATO COMERCIAL 3.38 PPM), GPN DEGRADADO (PRODUCTO DE DEGRADACIÓN DEL GLIFOSATO GRADO REACTIVO), GPN REACTIVO (GLIFOSATO GRADO REACTIVO 3.38 PPM) ....	43

## ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS USADOS

2AEP	2 Amino Etil Fosfonato
AMPA	Ácido Amino Metil Fosfonato
TCA	Ácido tricloro acetico
BSA	Albumina sérica bobina
C-P	Carbono-fósforo
C-Pliasa	Carbono-fósforo liasa
FMOC-Cl	Cloruro de Fluorenil metiloxi carbonilo
<i>PhnJ</i>	Componente catalítico de la C-Pliasa
DO	Densidad óptica
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
<i>PhnX</i>	Fosfonoacetaldehido hidrolasa
C	Fuente de carbono
N	Fuente de Nitrógeno
Pi	Fósforo inorgánico
GPn	Glifosato
FT-IR	Espectroscopia de Infrarrojo con transformada de Fourier
LB	Luria Bertani
M	Molar
MC	Medio de cultivo
MMMc	Medio Mineral Mínimo completo
mL	Mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
MPM	Marcadores de Peso Molecular
PolyP	Polifosfato
<i>PPK</i>	Polifosfato quinasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

RPM	Revoluciones por minuto
SOM	Materia orgánica del suelo
TCC	Ciclo del ácido carboxílico

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

### 1.1 INTRODUCCIÓN

El fósforo es un elemento químico que se encuentra ampliamente distribuido en los ecosistemas y juega un papel muy importante en el metabolismo de todas las formas de vida. En la naturaleza, suele encontrarse principalmente en suelos y sedimentos en forma de roca fosfórica, la cual es extraída y comercializada industrialmente. (Cooper *et al.*, 2011). Se estima que el 90% del uso total del fósforo comercializado es destinado a la producción de alimentos en forma de fertilizantes y herbicidas (Brunner, 2010).

El glifosato [N-(fosfonometil) glicina] es el herbicida derivado de fosfato más usado en la agricultura para el control de maleza. Es un herbicida no selectivo de amplio espectro post-emergencia, que pertenece a una familia de compuestos llamados fosfonatos (Van Stempvoort *et al.*, 2014). Éstos se caracterizan por contener un enlace covalente carbono-fósforo (C-P), que a diferencia del enlace lábil carbono-oxígeno-fósforo (C-O-P), es químicamente inerte, resistente a hidrólisis y fotólisis (Terman y Quinn, 1998).

El mecanismo de acción del glifosato se da a través de la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa, una enzima esencial en la ruta metabólica en plantas y bacterias para la síntesis de aminoácidos aromáticos. Dado que la ruta metabólica del shikimato no se encuentra presente en animales superiores, estos, aparentemente, no se ven afectados por el glifosato (Solomon *et al.*, 2007; Thongprakaisang *et al.*, 2013). A pesar de esta aparente inocuidad, en marzo del 2015, el Centro Internacional de Investigaciones Sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) clasificó al glifosato como probablemente carcinógeno para los seres humanos, ubicándolo en el grupo 2A de su lista de compuestos químicos. Esto debido principalmente a que se han presentado pruebas experimentales de que el glifosato

puede causar cáncer en animales de laboratorio, además de causar daño cromosomal en células humanas (International Agency for Research on Cancer, 2015). Esto ha traído como consecuencia un amplio estudio sobre la toxicidad del glifosato en microorganismos, ratones y células humanas (Martínez *et al.*, 2007; US Environmental Protection Agency, 2016).

Se estima que se han utilizado alrededor de 8.6 millones de toneladas de glifosato a nivel mundial desde su implementación en la agricultura en 1976 por Monsanto. Por otro lado, la vida media de degradación que presenta el glifosato depende del tipo del suelo, variando desde unos pocos días hasta meses e incluso años, mientras que los resultados en laboratorio muestran una vida media de degradación que va de 25 a 28 días (Moneke *et al.*, 2010; Cassigneul *et al.*, 2016). Por lo tanto, tomando en cuenta los efectos adversos del glifosato que se han reportado a la fecha, las grandes cantidades de glifosato liberado al ambiente y la estabilidad del herbicida, se ha incrementado en gran manera el interés en entender el mecanismo por el cual el glifosato es degradado o metabolizado por microorganismos (Kamat y Raushel, 2013).

A pesar de su amplia distribución en la naturaleza, son pocas las bacterias capaces de metabolizar el glifosato, ya que la enzima responsable del rompimiento del enlace C-P, la C-P liasa, solo está presente en una pequeña parte de la población procariótica (Villarreal-Chiu, Quinn y McGrath, 2012). Al romper el enlace C-P, las bacterias son capaces de liberar al grupo fosfato de la molécula y así emplearlo como una fuente de fósforo y energía (White y Metcalf, 2007; Wanner, 1994).

Cabe destacar que la degradación por medio de la C-P liasa depende fuertemente de los niveles de fosfato en el ambiente (Villarreal-chiu y Acosta-cortés, 2017), por lo que esta enzima solo es activada en las bacterias cuando el fósforo está limitado en el ambiente. Esto hace que el glifosato suela ser degradado por una segunda vía, la cual incluye una oxidación inicial del herbicida, produciendo ácido aminometilfosfónico (AMPA), el cual

es un producto metabólico más tóxico y persistente que el glifosato, agravando así el problema de contaminación ambiental.

Dado que el fósforo presente en el ambiente suele encontrarse en niveles relativamente altos, éstos son suficientes para reprimir la síntesis de la enzima C-P liasa y por ende la posibilidad de degradar el glifosato en un entorno natural se ve limitada, llevando el problema a una escala mayor con la generación y acumulación de AMPA en el ambiente (Quinn *et al.*, 2007).

## **1.2 JUSTIFICACIÓN**

Debido al alto riesgo para la salud humana y los ecosistemas que implica la acumulación del glifosato y su producto metabólico AMPA en el ambiente, es indispensable realizar estudios sobre microorganismos capaces de degradar este herbicida mediante un sistema alternativo a la C-P liasa que sea independiente de los niveles de fosfato con el fin de lograr superar las limitaciones que han existido para generar un proceso de biorremediación eficaz y generar así una propuesta biotecnológica que dé una solución real al problema ambiental al que la sociedad moderna se está enfrentando.

## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES

La invención del glifosato fue llevada a cabo por John E. Franz, a principios de los años 70's y patentada en 1974 con asignación a Monsanto Company, como un herbicida o fitotóxico. Tenía como objetivo, realizar un control selectivo del crecimiento de una o más especies de plantas en presencia de otras plantas. Obteniendo como resultado, un producto capaz de controlar el crecimiento de semillas, brotes, vegetación herbácea y leñosa y plantas acuáticas.

Meses antes de la aprobación de la patente, Spurrier, (1973) bajo consigna de Monsanto Company, reportó los aspectos técnicos de la aplicación del glifosato en campo. En donde menciona una aparente baja toxicidad para la fauna silvestre y con características de la formulación, que minimiza los riesgos para los trabajadores que aplican el herbicida. Ofreciendo un herbicida de amplio espectro, inocuo y de gran eficacia.

En los años posteriores a la invención del glifosato diferentes científicos como Rueppel *et al.*, (1977); Torstensson y Aamisepp, (1977), estudiaron el destino del glifosato en suelo, asociando la inactividad del glifosato principalmente con la degradación microbiana debido a que este compuesto mostró ser químicamente inerte. Además, identificaron al AMPA como el único metabolito significativo en suelo, proponiendo la ruta de degradación del glifosato vía AMPA.

Shinabarger *et al.* (1984), demostraron que microorganismos como *Pseudomonas* eran capaces de degradar una amplia gama de compuestos organofosfonatos, como los alquilfosfonatos, fosfonatos amino-terminales y arilfosfonatos a fin de utilizarlos como fuente de carbono. 2 años después el mismo grupo de trabajo describió la vía de degradación utilizada por *Pseudomonas* sp. para degradar fosfonatos. Utilizando

etiquetas radioactivas de [3-<sup>14</sup>C] identificaron a la sarcosina como el producto de descomposición inmediata, sugiriendo la existencia de una segunda vía de metabolización (Shinabarger y Braymer, 1986).

Wackett *et al.*, (1987) estudiaron la degradación del enlace carbono-fósforo, identificando a *Agrobacterium radiobacter*, como una bacteria capaz de degradar el enlace carbono-fósforo de un amplio rango de sustratos, incluyendo al glifosato. Atribuyeron esta capacidad degradativa con la actividad de una enzima a la que llamaron carbono-fósforo (C-P) liasa, la cual se inhibía en presencia de fósforo.

En el año 1988, Pipke y Amrhein estudiaron la degradación específica del glifosato por *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752 y demostraron que el glifosato era degradado vía AMPA, mineralizándolo completamente a CO<sub>2</sub>. Reportando la degradación del glifosato por una cepa bacteriana sin selección previa para la utilización del glifosato como fuente de fósforo. Tres años después, Liu *et al.* (1991) sugirieron que la capacidad de degradación del glifosato también se encontraba de forma generalizada en la familia *Rhizobiaceae*.

A principios de los años 90's, Chen *et al.* (1990) y Metcalf y Wanner (1993) identificaron las bases moleculares para el funcionamiento de la enzima C-P liasa. Para esto realizaron la mutagénesis de un plásmido que contenía el operón *phn*, utilizando el transposón TnphoA'-I para bloquear la expresión de los genes. De esta manera, demostraron que los genes necesarios para la degradación de fosfonatos se encuentran en 10.9 kb, divididos en catorce genes, a los cuales denominaron *phnCDEFGHIJKLMNOP*.

En estudios sobre la degradación biológica del glifosato, se ha determinado que existe un aumento considerable en las concentraciones de AMPA en muestras tomadas de un efluente de plantas de tratamiento de aguas residuales (67,5%) en comparación con el glifosato (17,5%), demostrándose así, que la degradación de glifosato vía AMPA es la más

distribuida entre las bacterias (Kolpin *et al.* 2006). Por otra parte, reportes proporcionados por Kjær *et al.*, (2005) mencionan que el AMPA es más persistente en los suelos que el glifosato, reportando tiempos de vida media de hasta 1.5 años.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos por Grandcoin *et al.*, (2017), quien demostró que el AMPA es más tóxico que el glifosato debido a que induce efectos tóxicos en eritrocitos humanos y daño en el DNA, se le debe prestar más atención a la acumulación de AMPA en el ambiente, debido a al riesgo latente a la salud humana.

A pesar demostrarse que la degradación de glifosato suele llevarse naturalmente vía AMPA, Quinn *et al.* (2007) y Kamat y Raushel (2013) han sugerido la posible existencia de enzimas alternativas a la C-P liasa capaces de degradar a los compuestos fosfonatos, incluyendo al glifosato. Estos investigadores describieron la capacidad de bacterias como *Pseudomonas* y *Enterobacter* de mineralizar fosfonatos independientemente de las condiciones ambientales. Algunos de los fosfonatos de origen biogénico degradados fueron el ácido 2-aminoetilfosfónico (ciliatina), ácido fosfonoacético y el ácido 2-amino-3-fosfonopropiónico (fosfonoalanina). Con esto abrieron la posibilidad de que existan nuevas reacciones y vías biológicas capaces de metabolizar fosfonatos aún desconocidas hasta el momento.

## CAPÍTULO 3

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 HIPÓTESIS

La bacteria *Bacillus cereus* 6P, nativa del Estado de Nuevo León, es capaz de biodegradar el herbicida glifosato por medio de una vía alternativa a la C-P liasa e independiente de los niveles de fosfato en el ambiente.

#### 3.2 OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la bacteria *Bacillus cereus* 6P es capaz de degradar el herbicida glifosato mediante una enzima distinta a la C-P liasa y de manera independiente a los niveles de fosfato en el ambiente.

#### 3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar las enzimas involucradas en el metabolismo de fosfonatos y polifosfatos en bacterias pertenecientes a la familia Bacillaceae
2. Demostrar mediante ensayos *in-vitro* la capacidad de metabolizar fosfonatos y polifosfatos por bacterias pertenecientes a la familia Bacillaceae
3. Evaluar los parámetros cinéticos y metabólicos del de la biodegradación del glifosato suministrado como única fuente de fósforo por la bacteria *Bacillus cereus* 6P
4. Demostrar la independencia de *Bacillus cereus* 6p a los niveles de fósforo en el ambiente para metabolizar el glifosato
5. Determinar la localización celular de la enzima degradadora investigada
6. Estudiar la toxicidad del residuo de la degradación de glifosato

## CAPÍTULO 4

### METODOLOGÍA

Este proyecto se llevó a cabo conjuntamente entre el Laboratorio de Biotecnología I de la Facultad de Ciencias Químicas y el Laboratorio L8 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. Dichos laboratorios proporcionaron los materiales y equipos necesarios que se requirieron para la terminación de este proyecto.

#### **4.1 ANÁLISIS DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE FOSFONATOS Y POLIFOSFATOS**

##### *4.1.1 Análisis bioinformático*

A fin de evaluar las enzimas involucradas en el metabolismo de fosfonatos y polifosfatos en miembros de la familia Bacillaceae, las secuencias aminoacídicas del componente catalítico de la C-P Liasa [PhnJ; número de acceso: AAA96997.1, (Blattner *et al.*, 1993)], fosfonoacetaldehido hidrolasa [PhnX; número de acceso: OJS53386.1, (Wang *et al.*, 2017)] y la polifosfato quinasa [PPK; número de acceso; ABF20121.1, ([Gilmour *et al.*, 2007)] fueron empleadas como moldes para llevar a cabo una búsqueda bioinformática en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés). Esto se llevó a cabo mediante un análisis BlastP, empleando la base de datos de secuencias proteicas no redundantes (nr) y la matriz Blosum 62. Como criterio de selección se empleó un valor de E-value menor a  $E^{-90}$  en bacterias pertenecientes a la familia Bacillaceae.

##### *4.1.2 Análisis molecular*

A fin de confirmar los resultados bioinformáticos obtenidos, se llevaron a cabo ensayos de PCR para determinar la presencia o ausencia de los genes estudiados en la bacteria *B. cereus* 6P, así como en *Escherichia coli* ATCC CRM-11229 (control positivo) y *B. cereus*

ATCC 10876 (control negativo). Para esto se diseñaron primers del componente catalítico de la C-P liasa (*phnJ*) y polifosfato quinasa (*ppk*) Tabla 1.

Tabla 1. Primers utilizados para la amplificación de los genes *phnJ* y *ppk*

Objetivo	Clave	Secuencia	TM	%GC	Longitud	Amplicón esperado
<b><i>phnJ</i></b>	<i>phnJ</i> F	TCAATCACCTTCAGCACGTC	59.8	50	20 bp	209
	<i>phnJ</i> R	AGCGGCTACAACCTTGCCTA	60.0	50	20 bp	
<b><i>ppk</i></b>	<i>ppk</i> F	TGAACGCCACTGACTTTCTG	60.0	50	20	287
	<i>ppk</i> R	ATAAAGCTGGGCAAAGCTGA	60.0	45	20	

El DNA genómico de las bacterias fue extraídos utilizando el kit one-4-all genomic DNA (Biobasic Inc, Markham, Canada) siguiendo las especificaciones del proveedor para bacterias Gram positivas, las cuales consistieron en la preparación de un cultivo en medio LB para cada bacteria dejándolo incubar durante una noche, después se recuperaron 1.5 mL del cultivo y se centrifugó a 10,000 rpm por 30 s y se retiró el sobrenadante, posteriormente se resuspendió en buffer de lisozima (20mg/ml de lisozima y 2mM EDTA) y se incubó a 37°C por 1 h. Pasado el tiempo de incubación, se añadieron 200 µL del buffer CL y 20 µL de proteinasa K, se agitó en vortex, se volvió a incubar por 30 min y se añadieron 200µL de etanol al 96% para después mezclar la solución vigorosamente. La mezcla se transfirió a una columna EZ-10 y se centrifugó a 9,000 rpm por 1 minuto, después de descartó el filtrado y se añadieron 500 µL de la solución CW1, se centrifugó a 9,000 rpm por 1 minuto y se descartó el filtrado nuevamente. Se añadieron 500 µL de la solución CW2 a la columna, se centrifugó a 9,000 rpm por 1 minuto y se descartó el filtrado nuevamente, posteriormente, se secó la membrana de la columna centrifugándola a 9,000 rpm por 2 min, después se transfirió el tubo colector a una microtubo de 1.5 mL nuevo y se incubó por 5 min para evaporar el etanol. Finalmente, para eluir el DNA, se añadieron 50 µL de agua al centro de la membrana, se incubó la columna por 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 9,000 rpm por 2 min.

Una vez extraído, la calidad del DNA genómico se visualizó a través de una electroforesis en gel de agarosa 0.8% con buffer TBE, teñido con GelRed Nucleic Acid Gel Stain, empleando fotodocumentador Mini-imager UV/LED (Maestrogen Inc; Hsinchu, Taiwan). A fin de cuantificar la concentración de DNA obtenido, se empleó un espectrofotómetro UV-Vis de tipo Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

La reacción de PCR se llevó a cabo con 12.5  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q, 5  $\mu\text{L}$  de My Taq buffer (Bioline), 0.5  $\mu\text{L}$  de Go Taq polimerasa (Bioline), 0.5  $\mu\text{M}$  de cada oligo y 2  $\mu\text{L}$  de DNA templado. La programación de la PCR fue de 95  $^{\circ}\text{C}$  / 5 min, 35 ciclos de 95  $^{\circ}\text{C}$  / 15 s, 54  $^{\circ}\text{C}$  / 15s, 72  $^{\circ}\text{C}$  / 30s y extensión final a 72 $^{\circ}\text{C}$  por 5 min en un termociclador 3Prime (Techne, UK). El producto de PCR fue visualizado mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% buffer TBE teñidos con GelRed Nucleic Acid Gel Stain.

## **4.2 ENSAYOS *IN-VITRO* PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD DE METABOLIZAR FOSFONATOS Y POLIFOSFATOS**

### *4.2.1 Comprobación del método de cuantificación de fosfonatos*

Para la cuantificación de fosfonatos naturales y sintéticos, entre ellos glifosato (GPn), 2 ácido aminoetil fosfónico (2AEP) y ácido aminometilfosfónico (AMPA), se empleó el método adaptado de Waiman *et al.*, (2012). Para esto se prepararon diferentes soluciones de los fosfonatos en KCl 0.1 M a diferentes concentraciones desde 0 hasta 300  $\mu\text{M}$ . Se mezclaron 3 mL de cada solución con 500  $\mu\text{L}$  de buffer de borato, posteriormente, se le añadieron 500  $\mu\text{L}$  de solución de cloruro de fluorenilmetiloxycarbonilo (FMOC-Cl) como agente derivatizador. Se homogenizó manualmente, y se dejó reposar a temperatura ambiente por 2 h, posteriormente cada solución se mezcló con 4 mL de triclorometano se agitó manualmente y se centrifugó a 4,000 rpm durante 6 min para separar el solvente. Se utilizó triclorometano para extraer la solución de FMOC-Cl en exceso y evitar la interferencia con mediciones espectrofotométricas. La fase acuosa que contiene el producto derivatizado se recuperó y se analizó utilizando espectrofotómetro UV-Vis (Varian Cary 50), el cuál registró el

espectro de absorción en un rango de 200-800 nm. Se empleó la longitud de onda de 295 nm para realizar la curva de calibración para cada fosfonato. Como solución blanco se utilizó una solución de buffer de KCl 0.1 M sin agregar fosfonatos y se siguió la metodología antes descrita.

#### *4.2.2 Reactivación y conservación de cepas*

Las cepas de trabajo fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Biotecnología I, ubicado en el edificio CELAES de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. Su reactivación se llevó a cabo en un cultivo utilizando caldo LB (Luria Bertani), incubándose en condiciones aerobias por 24 h a una temperatura de 28 °C con agitación constante de 150 rpm. Para su conservación se agregó 1mL del cultivo a un microtubo de polipropileno y se realizaron 5 centrifugaciones continuas eliminando el sobrenadante para concentrar la biomasa, al terminar las centrifugaciones se le añadieron 400 µL del cultivo a cada microtubo y 600µL de glicerol estéril al 50%, se homogenizó la solución y se conservó a una temperatura de -20°C.

#### *4.2.3 Determinar la capacidad de biodegradar glifosato y acumular polifosfato suministrando glifosato como única fuente de fósforo*

Se determinó la capacidad de biodegradar glifosato por *B. cereus* 6P y 4 cepas de referencia miembros de la familia Bacillaceae: *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis* y *B. clausii*. Para esto se realizaron ensayos inoculados a una densidad óptica de 0.05 en medio mineral mínimo completo (MMM<sub>c</sub>), el cuál contenía acetato de sodio como fuente de carbono (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>), Cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) como fuente de nitrógeno y glifosato como fuente de fósforo. Las condiciones de incubación fueron 28 °C y 150 rpm. Las muestras se tomaron al final del experimento, después de 120 h y se determinaron las proteínas totales, el porcentaje de degradación de glifosato y la presencia de gránulos de polifosfatos.

#### *4.2.3.1 Determinación de proteínas totales*

Para la precipitación de proteínas, se recuperó 1mL de cada cultivo en un microtubo de polipropileno y se le agregaron 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) al 100%, se incubó en hielo por 10 min para favorecer la precipitación de las proteínas y se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 50  $\mu$ L de NaOH 0.1 N y se agitó en vortex por 1 min.

La cuantificación de proteínas totales se llevó a cabo por el método de Bradford, donde se agregó a una cubeta de espectrofotómetro 20  $\mu$ L de la solución de NaOH 0.1N con las proteínas y 1 mL de la solución de Bradford. Se dejó incubar por 20 min y se determinó la absorbancia utilizando un espectrofotómetro Uv-Vis Spectronic Genesys 20 (Termo spectronic, Virginia, USA) a una longitud de onda de 595 nm.

#### *4.2.3.2 Cuantificación de glifosato*

Se empleó el método adaptado de Waiman *et al.*, (2012), donde se recuperaron 900  $\mu$ L de cada cultivo en un microtubo de polipropileno y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se filtró utilizando un filtro de 0.22  $\mu$ m para evitar que la biomasa suspendida en el medio interfiera con las lecturas. Al sobrenadante filtrado se le agregó 2.25 mL de KCl 0.1M, después el sobrenadante se mezcló con 500  $\mu$ L de buffer de borato, posteriormente, se le añadieron 500  $\mu$ L de solución de cloruro de fluorenilmetiloxycarbonilo (FMOC-Cl). Se homogenizó manualmente, y se dejó reposar a temperatura ambiente por 2 h, posteriormente la solución se mezcló con 4 mL de triclorometano, se agitó manualmente y se centrifugó a 4,000 rpm durante 6 min para separar el triclorometano. La fase acuosa que contiene FMOC-Cl se recuperó y se cuantificó mediante espectrofotometría UV-VIS a 295 nm para la cuantificación de glifosato.

#### 4.2.3.3 Visualización de gránulos de polifosfato

Se recuperó 1 mL del cultivo en un microtubo de polipropileno y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min en una microcentrífuga 5415D (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), se descartó el sobrenadante y se lavó con solución salina estéril. Se centrifugó nuevamente y se almacenó la biomasa a -20°C durante 20 h en un congelador CVPS15 (Torrey, Monterrey, México) para ocasionar poros en la membrana de la bacteria permitiendo que moléculas de colorante puedan acceder a las estructuras del interior de las células. Después se resuspendió en 100 µL de solución salina estéril y se agregaron 200 µL de solución de tinte DAPI. Se incubó durante 2 h a -20 °C para que ocurra la reacción entre el marcador de fluorescencia DAPI con el polifosfato, posteriormente se realizó un frotis fijando con calor la biomasa tratada sobre un portaobjetos. Finalmente se observó en un microscopio de fluorescencia DM-3000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) observándose en el filtro para DAPI ( $\lambda = 358$  nm excitación y  $\lambda = 463$  nm emisión), para la observación de gránulos de polifosfato de color verde fluorescente, mientras que DAPI unido a ácidos nucleicos tiene un color azul fluorescente (Smith y Morrissey, 2007).

#### 4.2.4 Determinar la capacidad de biodegradar ácido 2-aminoetil fosfónico (2AEP) y acumular polifosfato suministrando 2AEP como única fuente de fósforo

Se determinó la capacidad de biodegradar 2AEP por *B. cereus* 6P y 4 cepas de referencia miembros de la familia Bacillaceae: *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis* y *B. clausii*. Para esto se realizaron ensayos inoculados a una densidad óptica de 0.05 en medio mineral mínimo completo (MMM<sub>c</sub>), el cuál contenía acetato de sodio como fuente de carbono ( $C_2H_3NaO_2$ ), cloruro de amonio ( $NH_4Cl$ ) como fuente de nitrógeno y 2AEP como fuente de fósforo. Las condiciones de incubación fueron 28 °C y 150 rpm. Las muestras se tomaron al final del experimento, después de 120 h y se determinaron las proteínas totales, el porcentaje de degradación de glifosato y la presencia de gránulos de polifosfatos mediante las técnicas descritas anteriormente.

### **4.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE BIODEGRADACIÓN DE GLIFOSATO, SUMINISTRANDO GP<sub>n</sub> COMO ÚNICA FUENTE DE FÓSFORO**

A fin de determinar los parámetros cinéticos de biodegradación de glifosato, se realizó un ensayo empleando un inóculo inicial de 0.05 D.O. para *B. cereus* 6P, en medio mineral mínimo completo (MMM<sub>c</sub>) utilizando acetato de sodio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) como fuente de carbono, cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) como fuente de nitrógeno y glifosato como fuente de fósforo. El cultivo se incubó a 28 °C y 150 rpm. Se realizaron tomas de muestras por triplicado cada 12 h para determinar proteínas totales y la concentración de glifosato en el sobrenadante. Además, se determinó la concentración fósforo presente, se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC), se visualizó la formación de esporas y se cuantificó la acumulación de polifosfato. Como controles negativos, se utilizaron dos fuentes de fósforo adicionales, fenilfosfonato y metilfosfonato.

#### ***4.3.1 Determinación del fósforo inorgánico***

Se recuperó 1 mL del cultivo de *Bacillus cereus* 6P en un microtubo de polipropileno y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min en una microcentrífuga, se recuperaron 100µL del sobrenadante y se le adicionó 1 mL de Biomol Green y se incubó por 10 min. El fosfato en el medio formará un complejo fosfomolibdato verde de malaquita que tiene una máxima absorción a 620 nm, por lo que se midió la D.O. en un espectrofotómetro (spectronic genesys 20) a una longitud de onda de 620 nm por consiguiente la absorbancia a 620 nm fue directamente relacionada con la concentración de fosfato libre en el medio.

#### ***4.3.2 Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)***

Se recuperó 1mL del cultivo y se realizaron diluciones seriadas hasta la 1x10<sup>-7</sup>. Se sembraron 100 µL de las últimas 3 diluciones en placas con agar LB (Luria Bertani) por

extensión con varilla de vidrio. Se dejaron incubar las placas por 24 h a 28°C y se realizó el conteo de las UFC en las placas donde el crecimiento fuera de entre 30-300 colonias.

#### *4.3.3 Visualización del desarrollo de esporas*

Se tomo una asada del cultivo y se realizó un frotis en un portaobjetos. Se cubrió el frotis con la solución de verde Malaquita y se colocó a fuego directo por 5 min, evitando la ebullición. Se lavó con agua y se aplicó Safranina por 1 min, para favorecer el contraste, posteriormente se lavó y dejó secar. Se observó en un microscopio óptico al 100X.

#### *4.3.4 Cuantificación de la acumulación de polifosfato*

Para la cuantificación de polisfosfato se llevó a cabo la metodología descrita por (Kulakova *et al.*, 2011). Se recuperó 1 mL del cultivo de *Bacillus cereus* 6P en un microtubo de polipropileno y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min en una microcentrífuga 5415D (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Después se neutralizó con 50 µL de NaOH 2 M y 100 µL de buffer Tris de pH 7.5. Se centrifugo a 4000 rpm durante 20 min y una temperatura de 4°C en una centrifuga DSC-15125D-1 (LW Scientific, CDMX, Mexico). Se le agregó a una columna de sílice (Roche) 600 µL de KI 6M y 150 µL de sobrenadante. Se centrifugó a 4,000 rpb durante 5 min y se lavó la columna 2 veces con buffer (10 mM tris buffer pH 7.5, 50% etanol, 1 mM EDTA y 10 mM NaCl). Finalmente, se eluyó el polifosfato en 50 µL de agua.

### **4.4 INDEPENDENCIA DE BACILLUS CEREUS 6P A LOS NIVELES DE FÓSFORO EN EL AMBIENTE PARA METABOLIZAR EL GLIFOSATO**

Se realizó un cultivo con un inculo inicial de 0.05 D.O. para *B. cereus* 6P, en medio mineral mínimo completo (MMMc) controlando las fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato, utilizando C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> (C) como fuente de carbono, NH<sub>4</sub>Cl (N) como fuente de nitrógeno y glifosato (GPn) suplementado con K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> como fósforo inorgánico (Pi) como fuente de fósforo, como se muestra en la Tabla 2. Empleando condiciones de incubación

a 28 °C y 150 rpm. Se tomo una muestra a las 240 h para la determinación de proteínas totales, midiéndose con la metodología descrita anteriormente.

Tabla 2. Fuente de carbono, nitrógeno y fósforo utilizado.

Condiciones de evaluación	Relación de Redfield			
	C	N	P	GPn
<b>Fósforo inorgánico como fuente de fósforo</b>	100	16	1	-
<b>Glifosato como fuente de fósforo</b>	100	16	-	1
<b>Fósforo inorgánico más Glifosato como fuente de fósforo</b>	100	16	0.5	0.5
<b>Medio sin fósforo</b>	100	16	-	-

#### 4.5 DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE LA POTENCIAL ENZIMA DEGRADADORA

Del cultivo de *Bacillus cereus* 6P donde se utilizó GPn como única fuente de fósforo con una incubación de 120h, se realizó un fraccionamiento celular siguiendo el esquema del fraccionamiento mostrado en la Figura 1.

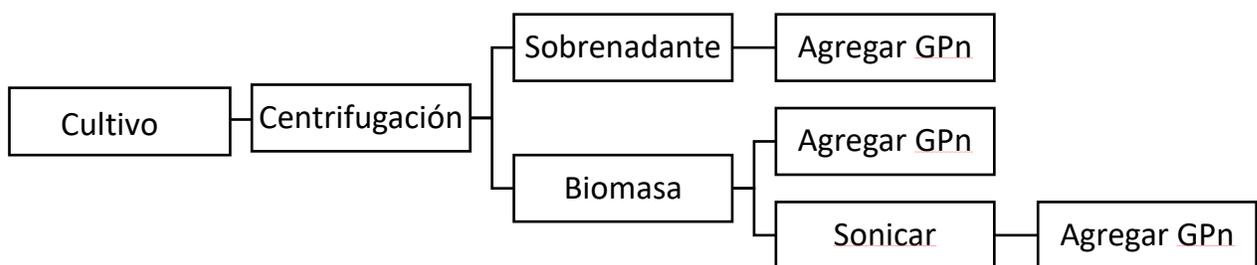


Figura 1. Esquema general del fraccionamiento celular realizado al cultivo de *Bacillus cereus*.

El sobrenadante del cultivo se le añadió GPn 1mM y se incubó a 28 °C y 150 rpm.

La biomasa precipitada del cultivo se dividió en dos. La primera parte se lavó 2 veces con solución salina 0.85%, se resuspendió en solución salina 0.85%, se le añadió GPn 1mM y se incubó a 28 °C y 150 rpm. La segunda parte se lavó 2 veces con solución salina 0.85%, se resuspendió en solución salina 0.85% y se llevó a cabo el siguiente procedimiento de sonicación: Amplitud 100%, lapso 1 min, incubación en hielo 3 min, realizándolo 6 veces. Posteriormente se centrifugó a 4000rpm x 10 min y se recuperó el sobrenadante. Se le añadió GPn 1mM y se incubó la biomasa sonicada a 28 °C y 150 rpm.

Se realizaron ensayos de degradación por triplicado a las 4 fracciones del cultivo a las 96 h, para determinar la localización potencial enzima degradadora. Para esto se recuperó 1 mL de cada fracción con la cual se determinó la concentración de fósforo inorgánico y glifosato en el sobrenadante.

#### **4.6 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL RESIDUO DE DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO**

Para estudiar la biocompatibilidad del producto de degradación del glifosato por *B. cereus* 6P, se realizaron bioensayos de toxicidad aguda en lombrices *Eisenia foetida* bajo 4 condiciones como se muestra en la Tabla 3, realizando cada ensayo por triplicado.

Tabla 3. Condiciones del bioensayo con lombrices *Eisenia foetida*

# de condición	Condición
1	Control (agua)
2	Glifosato comercial (3.38 ppm)
3	Producto de degradación del glifosato grado reactivo
4	Glifosato grado reactivo (3.38 ppm)

Para llevar a cabo el bioensayo, se pesaron 100 g de tierra y se colocaron en contenedores de plástico. Posteriormente se depositaron para cada ensayo, 10

lombrices que contaran con el clitelo (engrosamiento en el tercio anterior del cuerpo) con un peso total por ensayo de  $4.9 \pm 0.3$  g. Se le añadió 5 g de alimento (composta de café) por semana, previamente mezclados con 2 mL de agua, glifosato comercial (3.38 ppm), el producto de degradación del glifosato grado reactivo o glifosato grado reactivo (3.38 ppm) según sea la condición. Se almacenaron por cuatro semanas sin exposición a la luz directa a temperatura ambiente. Cada 7 días, se retiraban las lombrices del contenedor, se lavaban con agua y se pesaban, registrando el peso. Al término del ensayo se contabilizó la mortalidad y el número de crías.

#### **4.7 DISPOSICIÓN DE RESIDUOS GENERADOS**

Los residuos generados fueron clasificados de acuerdo con el documento de procedimientos para clasificación de residuos peligrosos PR-CLB-SRR/000 de la Facultad de Ciencias Químicas establecido por el Departamento de Manejo y Control de Residuos de la institución.

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1 ANÁLISIS DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE FOSFONATOS Y POLIFOSFATOS

A través del análisis bioinformático llevado a cabo, se determinó que el componente catalítico de la C-P liasa (PhnJ), no está presente en ningún miembro de la familia Bacillaceae (Tabla 4), lo que sugeriría que estos microorganismos Gram positivos, son incapaces de metabolizar el glifosato. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Villarreal-Chiu, Quinn y McGrath, (2012) quienes mencionaron que PhnJ no se encontró presente en ningún miembro del Filo Firmicutes, incluyendo la familia Bacillaceae.

Sin embargo, se conocen otras enzimas capaces de degradar fosfonatos, por lo que se investigó la presencia de la enzima fosfonoacetaldehído hidrolasa (PhnX), cuyo sustrato específico es el 2-aminoetil fosfonato (2AEP). De esta manera se encontró que la enzima PhnX está presente en todos los miembros de la familia Bacillaceae estudiadas (Tabla 4).

Tabla 4. Homólogos del componente catalítico de la C-P Liasa (PhnJ), fosfonoacetaldehído hidrolasa (PhnX) y la polifosfato quinasa (PPK).

	PhnJ	PPK	PhnX
<i>B. cereus</i>	✘	✓	✓
<i>B. licheniformis</i>	✘	✘	✓
<i>B. thuringiensis</i>	✘	✓	✓
<i>B. subtilis</i>	✘	✘	✓
<i>B. clausii</i>	✘	✘	✓

Esto sugiere que los miembros de la familia Bacillaceae son en teoría, capaces de degradar el fosfonato biogénico 2AEP y utilizarlo como fuente de fósforo (Figura 2)

(Kamat y Raushel, 2013). No obstante, se ha demostrado experimentalmente que esta enzima presenta una alta especificidad al 2AEP y no presenta actividad frente al glifosato (Villarreal-Chiu, Quinn y McGrath, 2012; Kamat y Raushel, 2013).

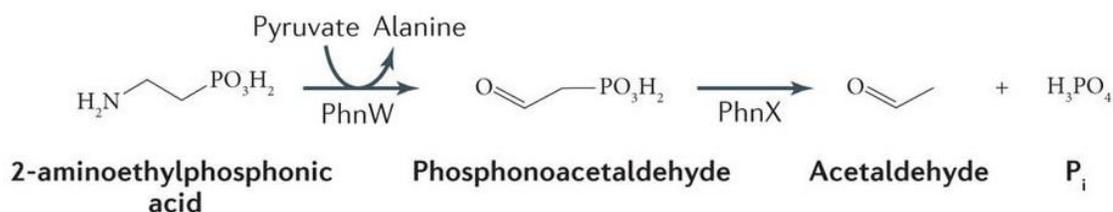


Figura 2. Ruta metabólica de degradación del ácido 2-aminoetil fosfónico en bacterias (Quinn et al., 2007).

Por otra parte, la enzima polifosfato quinasa (PPK), enzima responsable de la síntesis de polifosfato a partir de monómeros de fósforo, solo fue localizada en el proteoma de las bacterias *B. cereus* y *B. thuringiensis*. Estos resultados sugieren que de entre todos los miembros de la familia Bacillaceae, solo algunas especies son capaces de acumular fosfato en forma de polifosfato. Esto concuerda con lo reportado por Shi, Rao y Kornberg, (2004), quienes mencionan que un grupo de enzimas relacionadas con el metabolismo de polifosfato, incluidas la PPK, exopolifosfatasa (PPX) y fosfonotrasnferasa (PAP) fueron detectadas en *B. cereus*, pero no en otras especies del mismo género.

Los resultados *in-silico* fueron confirmados por experimentos de PCR, los cuales demostraron la presencia del gen *phnJ* en la cepa control de *E. coli*, mas no así en las cepas de *B. cereus*. En la Figura 3 se muestra el gel de electroforesis realizado para visualizar la amplificación. El carril 1, corresponde al marcador de pares de bases HyperLadder, el carril 2, corresponde al control negativo en donde se sustituyó la muestra de DNA por agua, en el carril 3, se colocó el control positivo en donde se utilizó DNA de *E. coli* y se presentó un fragmento de 209pb, correspondiente al amplicón buscado de *phnJ*, los carriles 4 y 5, corresponden a las muestras de *B. cereus* 6P y *B. cereus* en donde no se presentó ninguna banda de amplificación.

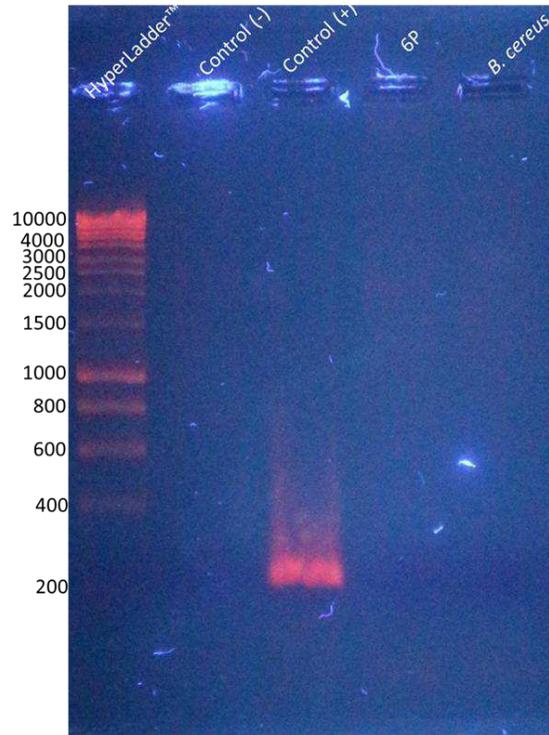


Figura 3. Gel de electroforesis correspondiente a la amplificación de *phnJ* de *B. cereus* 6P

La ausencia del componente catalítico *phnJ* en los miembros del género *Bacillus* demuestra la inexistencia de la enzima responsable de la degradación biológica del glifosato (Figura 4) y la incapacidad teórica de estos microorganismos para llevar a cabo este proceso *in-vivo* (Wang *et al.*, 2016).

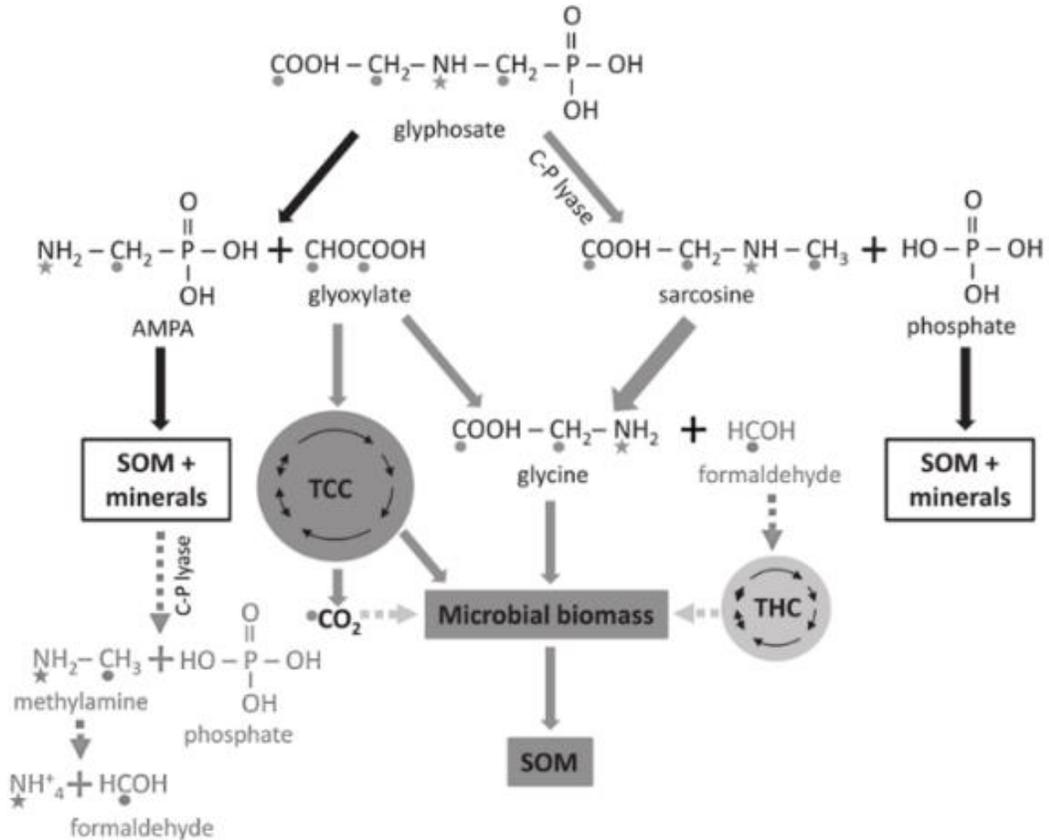


Figura 4. Ruta metabólica de degradación del glifosato en bacterias. Vías de degradación a través de AMPA y sarcosina. TCC: ciclo del ácido tricarbóxico; THC: ciclo de tetrahidrofolato; SOM: materia orgánica de suelo (Wang et al., 2016).

Los resultados de PCR demuestran la existencia del gen *ppk* en las cepas de estudio, particularmente en *B. cereus* 6P. En la Figura 5 se muestra el gel de electroforesis realizado para visualizar la amplificación del gen *ppk*. El carril 1, corresponde al marcador de pares de bases HyperLadder, el carril 2, corresponde al control negativo en donde se sustituyó la muestra de DNA por agua, en el carril 3, se colocó el control positivo en donde se utilizó DNA de *E. coli* y se presentó un fragmento de 287 pb, correspondiente al amplicón buscado de *ppk*, los carriles 4 y 5, corresponden a las muestras de *B. cereus* 6P y *B. cereus* en donde se observan dos bandas de amplificación, una banda de 287 pb correspondiente al amplicón buscado de *ppk* y otra banda localizada entre 1500 y 2000 pb que no fue identificada.

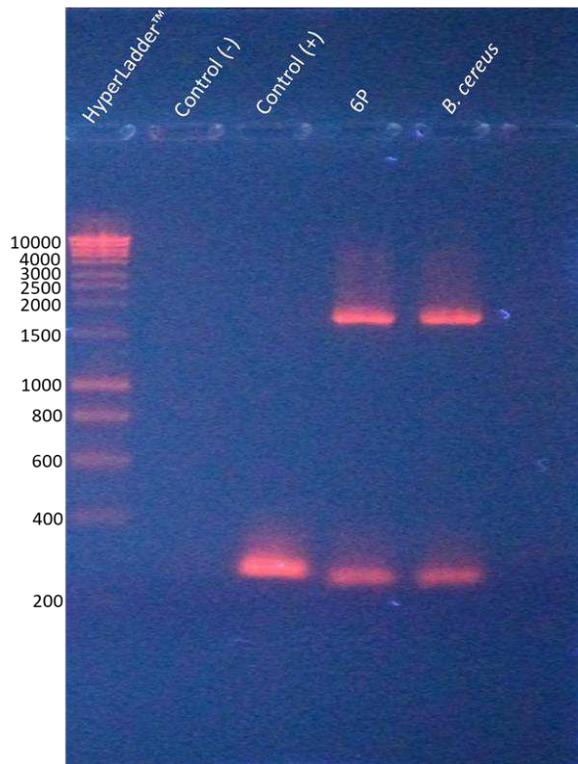


Figura 5. Gel de electroforesis correspondiente a la amplificación de PPK de *B. cereus* 6P

La presencia del amplicón correspondiente al gen *ppk* en *B. cereus* 6P sugiere que esta bacteria es capaz de almacenar fosfato en forma de gránulos de polisfosfato en el interior de la célula (Shiba et al., 2000), proceso representado en la Figura 6.

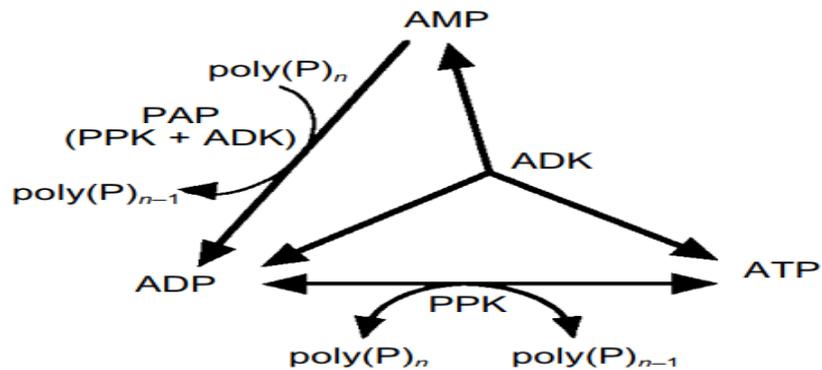


Figura 6. Ruta metabólica de la síntesis de PolyP en bacterias (Shiba et al., 2000).

## 5.2 ENSAYOS *IN-VITRO* PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD DE METABOLIZAR FOSFONATOS Y POLIFOSFATOS

Debido a la dificultad que existe en la actualidad para la cuantificación de fosfonatos por medios instrumentales, se llevó a cabo la implementación de un método espectrofotométrico basado en el método de Waiman *et al.*, (2012), debido a que es un método que ha demostrado ser reproducible, económico y accesible.

El método fue implementado para los fosfonatos de interés del presente trabajo, incluyendo el glifosato, AMPA y 2AEP. Estos 3 diferentes fosfonatos tienen en común la presencia de los grupos fosfonato y amino en sus estructuras (Figura 7), siendo este último, el grupo que participa en la reacción de derivatización al reaccionar con el FMOC-Cl (Figura 7). Cada uno de los fosfonatos derivatizados muestra absorbancia en la región UV del espectro electromagnético debido a la presencia de grupo aromático que provee el FMOC-Cl.

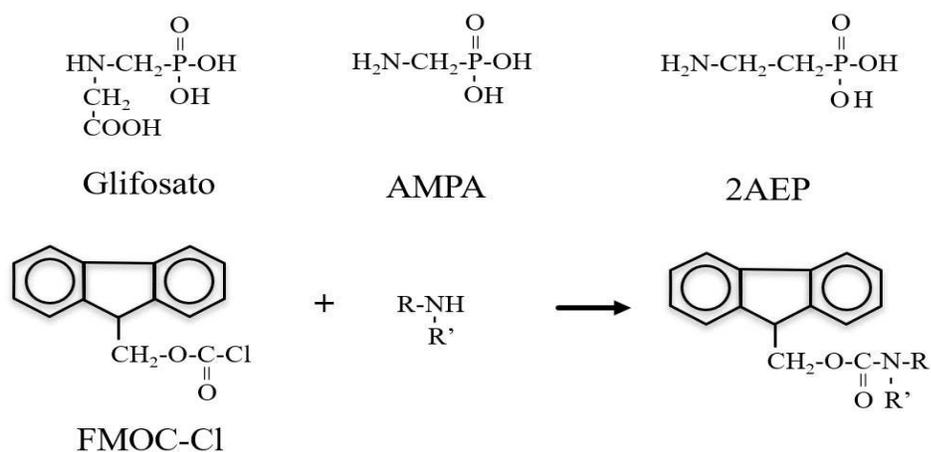


Figura 7. Estructuras químicas del glifosato, AMPA y 2AEP. Reacción de derivatización con FMOC-Cl. R: H o grupo alquilo. Modificado de (Ibáñez *et al.*, 2005; Kleps *et al.*, 2007)

Los resultados del barrido de absorción a lo largo de la zona de absorción del UV obtenidos para el glifosato derivatizado se muestran en la Figura 8. En ella se observa el

espectro de absorción de las soluciones de glifosato que van de concentraciones de 0 a 300  $\mu\text{M}$ . El glifosato derivatizado muestra diferentes absorbancias, de las cuales se tomó la de 295 nm en vista que mostraba valores de absorbancia por debajo de 1.

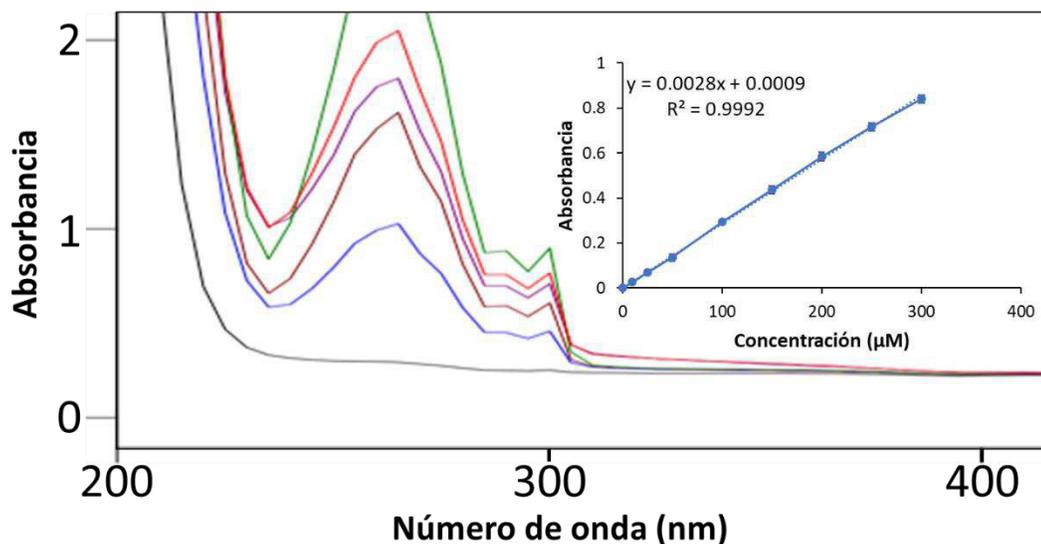


Figura 8. Espectro UV-vis del glifosato derivatizado con FMOCl a diferentes concentraciones de glifosato de 0 hasta 300  $\mu\text{M}$ . El recuadro muestra la regresión en línea recta obtenida a 295 nm.

Al representar esta absorbancia en función de la concentración de glifosato, se obtuvo un coeficiente de regresión lineal de 0.9992, manteniéndose una linealidad en el rango de concentración de glifosato de 10 a 300  $\mu\text{M}$ . Ésta fue comparable con otros trabajos como los obtenidos por ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) y cromatografía líquida de intercambio aniónico acoplado a espectrometría de masas en tándem por electrospray. Además, este método presentó un rango de detección menor (Chen *et al.*, 2013; Mörtl *et al.*, 2013).

Por otra parte, los resultados obtenidos para el AMPA derivatizado, muestran una absorción de las soluciones a concentraciones de 0 a 300  $\mu\text{M}$  (Figura 9). El AMPA derivatizado muestra diferentes absorbancias, de las cuales se tomó la de 295 nm dado que mostraba valores de absorbancia por debajo de 1.

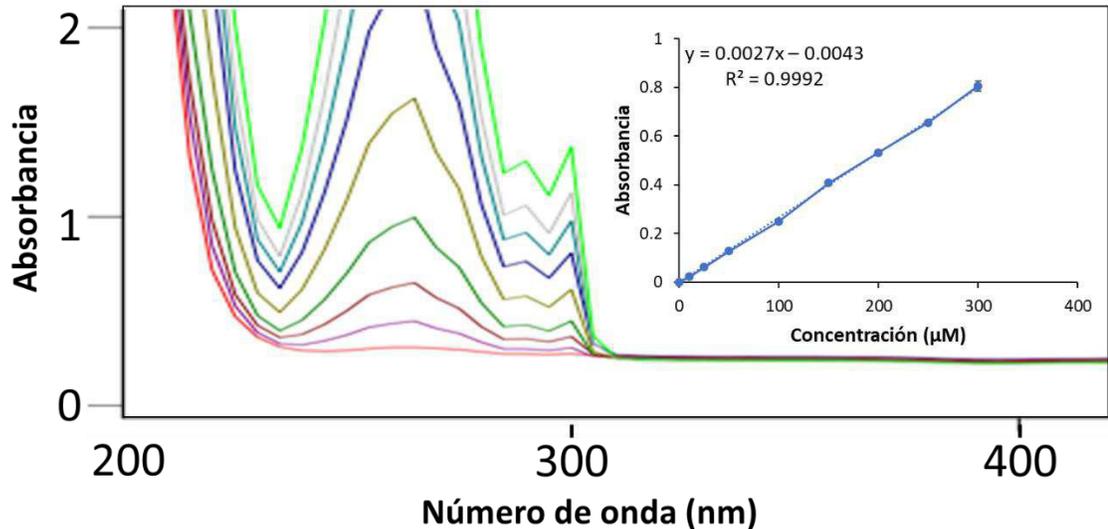


Figura 9. Espectro UV-vis del AMPA derivatizado con FMOCl a diferentes concentraciones de glifosato de 0 hasta 300  $\mu\text{M}$ . El recuadro muestra la regresión en línea recta obtenida a 295 nm.

Al representar esta absorbancia en función de la concentración, se obtuvo un coeficiente de regresión lineal de 0.9993 con una linealidad en el rango de concentración de 10 a 300  $\mu\text{M}$ . De esta manera, se logró demostrar que esta metodología puede llegar a ser una buena alternativa a la metodología actual para la detección de AMPA, siendo más rápida y económica que las cromatografías líquidas de ultra-rendimiento acoplado a masas/masas (UPLC-MS/MS) o de masas triple cuadrupolo. (Guo *et al.*, 2018; Pinto, Soares y Ferreira, 2018). Sin embargo, a pesar de la sencillez del método, la metodología instrumental sigue presentando una sensibilidad menor, presentando un rango de detección de AMPA de 2 a 590 nM.

De igual manera, los resultados obtenidos para el 2AEP derivatizado demuestran una absorción de las soluciones de concentraciones que van de 0 a 300  $\mu\text{M}$  (Figura 10). El 2AEP derivatizado muestra diferentes absorbancias, de las cuales se tomó la de 295 nm debido a que mostraba valores de absorbancia por debajo de 1.

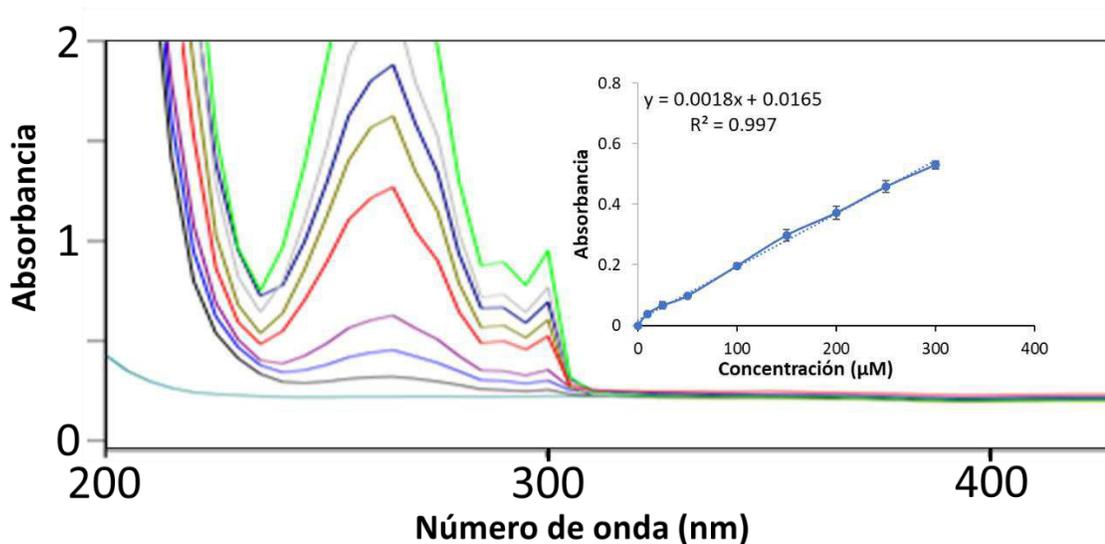


Figura 10. Espectro UV-vis del 2AEP derivatizado con Fmoc-Cl a diferentes concentraciones de glifosato de 0 hasta 300  $\mu\text{M}$ . El recuadro muestra la regresión en línea recta obtenida a 295 nm.

La linealidad obtenida para el 2AEP fue observada en un rango de concentración de 10 a 300  $\mu\text{M}$ , con un coeficiente de regresión lineal de 0.997. El 2AEP fue el primer compuesto natural que se descubrió con un enlace C-P. Investigaciones posteriores demostraron que este compuesto es un constituyente común en los lípidos, proteínas y polisacáridos de organismos primitivos, por lo tanto, está ampliamente distribuido en la naturaleza (Kononova y Nesmeyanova, 2002). Sin embargo, a pesar de su amplia distribución, no existen métodos de detección y cuantificación para este fosfonato o no han sido mejorados en las últimas 2 décadas, siendo la cromatografía en capa fina y cromatografía de gas las metodologías utilizadas para su identificación. Dichas metodologías empleaban tiempos de preparación mayores a 12 h y la utilización de columnas con un largo mayor a 2 metros con un flujo de nitrógeno como gas portador (Wackett *et al.*, 1987; Schowanek y Verstraete, 1990)

De esta manera, al haber establecido un método accesible y rápido para la cuantificación de los diferentes fosfonatos a emplear en este trabajo, se analizó la capacidad de biodegradación del glifosato por la bacteria *B. cereus* 6P, usando como control distintas

bacterias de la familia Bacillaceae, como lo son *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis* y *B. clausii*.

Como puede observarse en la Figura 11, el desempeño que tuvieron las distintas bacterias de la familia Bacillaceae para degradar el glifosato fue bastante diverso. De las 5 bacterias empleadas, *Bacillus cereus* 6P, fue la bacteria que tuvo un mayor incremento en proteínas totales, así como un mayor porcentaje de degradación de glifosato, alcanzando un 37% a las 120 h. Dado que el incremento en proteínas totales señala un crecimiento de biomasa en un cultivo celular, este resultado sugiere el crecimiento de la población de *B. cereus* 6P, evitando interferencias o falsos positivos en mediciones de turbidez (Zubkov *et al.*, 1999; Lo *et al.*, 2015). Por otra parte, las bacterias control *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis* y *B. clausii* mostraron poco o nulo incremento en proteínas totales al igual que un bajo porcentaje de degradación.

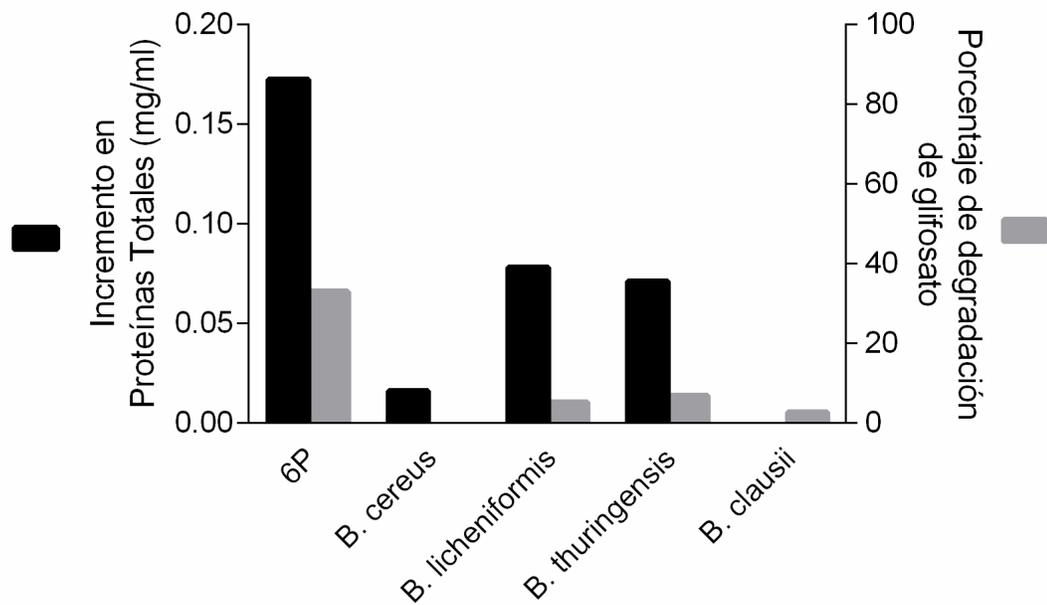


Figura 11. Producción de biomasa y degradación de glifosato por bacterias de la familia Bacillaceae utilizando GPn como única fuente de fósforo.

Con estos resultados se sugiere que *B. cereus* 6P, es el único representante de la familia Bacillaceae que tiene la capacidad de metabolizar el glifosato y utilizarlo como fuente de fósforo.

La tinción con DAPI utilizada para identificar polifosfato intracelular mostró resultados positivos para la cepa 6P, al ser observados los gránulos con una coloración amarilla/verde fácilmente diferenciable de la emisión azul dada por la interacción DAPI-DNA (Smith y Morrissey, 2007; Gomes *et al.*, 2012). Las micrografías muestran gran diferencia entre la cepa 6P y las diferentes bacterias de la familia Bacillaceae (Figura 12).

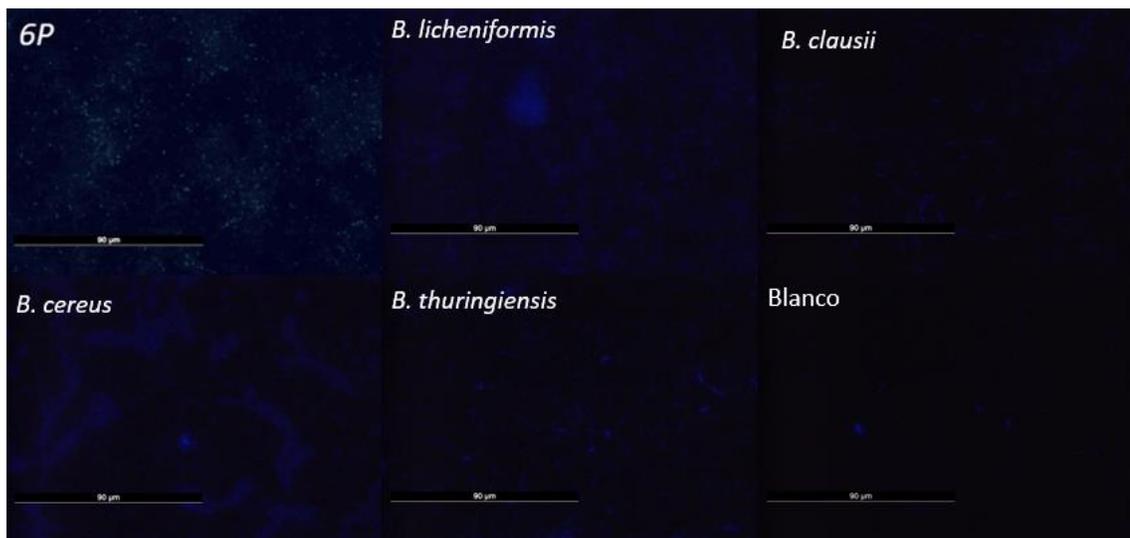


Figura 12. Tinción DAPI para identificación de Polifosfato en bacterias de la familia Bacillaceae utilizando glifosato como única fuente de fósforo.

La micrografía obtenida para *B. cereus* 6P, que se puede apreciar de mejor manera en la Figura 13 confirman la capacidad de esta bacteria para transformar glifosato en polifosfato. En el caso contrario para las bacterias que se utilizaron como control, no se observaron gránulos en color verde debido a su incapacidad de metabolizar el glifosato y liberar el fósforo al medio o acumularlo en forma de polifosfato.

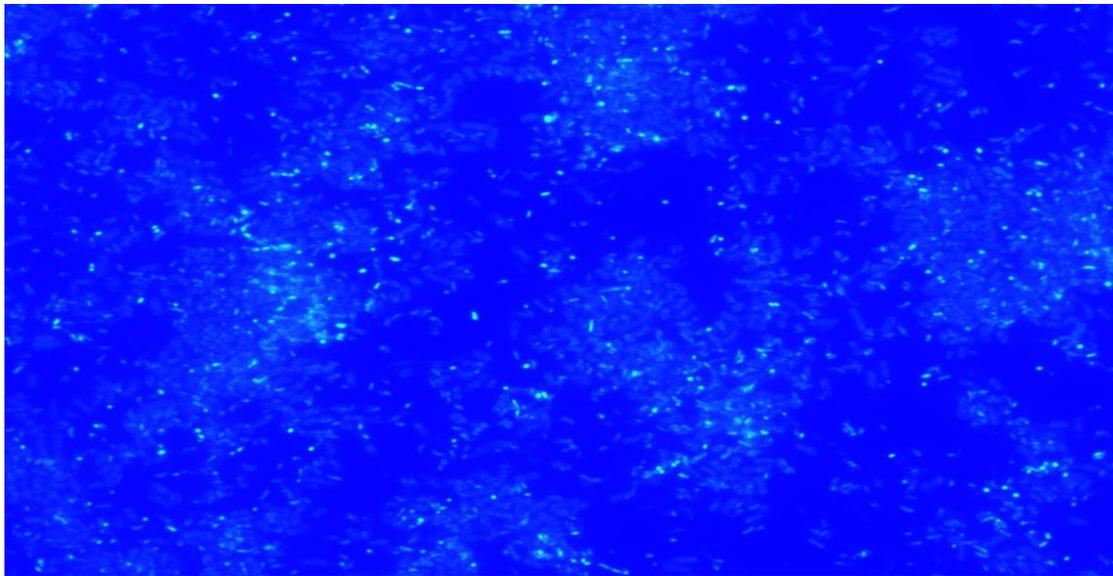


Figura 13. Acumulación de gránulos de Polifosfato en MMMc con glifosato como única fuente de fósforo por *Bacillus cereus* 6P. observado con tinción DAPI en microscopio de fluorescencia.

Los resultados sobre la presencia de gránulos de polifosfato coinciden con lo mencionado por Shi, Rao y Kornberg, (2004); Doruk *et al.*, (2013), quienes mencionan que los gránulos de polifosfato son cadenas de cientos de residuos de Pi unidos por enlaces fosfoanhídridos que se forman como un reservorio de fósforo ante condiciones adversas y son sintetizados por diferentes bacterias como *B. cereus* y *B. thuringiensis* en presencia de fósforo.

Con estos resultados, se hace mención, que la presencia de los gránulos de polifosfato en *B. cereus* 6P indica que el Pi se encontraba disponible como consecuencia del corte en el enlace C-P del glifosato y a que la enzima *PPK* estaba presente, como se indicó en los análisis bioinformáticos y moleculares realizados. Lo que contrasta con las bacterias que se utilizaron como control, en donde, a pesar de contar con la enzima *PPK*, el Pi no estaba disponible debido a que no se realizó el corte del enlace C-P del glifosato.

Para demostrar que no existe una interferencia por parte de la enzima PhnX en la degradación de glifosato, las bacterias de la familia Bacillaceae fueron sometidas a

ensayos de biodegradación del 2AEP. Como puede observarse en la Figura 14, los resultados confirmaron que todas las bacterias empleadas son capaces de metabolizar 2AEP como fuente de fósforo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por autores como Talbot, Johnson y Munneckew, (1984) y Singh y Walker, (2006), quienes describieron la capacidad de algunas cepas de *B. cereus* para degradar el 2AEP y emplearlo como fuente de fósforo para su crecimiento.

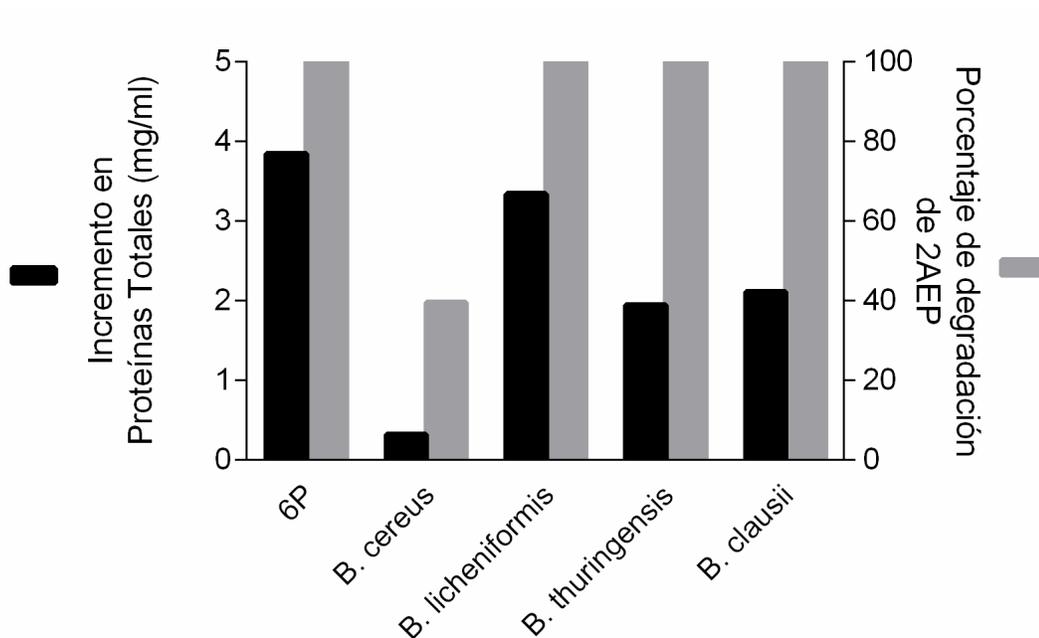


Figura 14. Producción de biomasa y degradación de 2AEP por bacterias de la familia Bacillaceae utilizando 2AEP como única fuente de fósforo.

Comparando las Figuras 12 y 15, se puede observar que los perfiles de crecimiento y degradación presentados por las bacterias frente a ambos compuestos son diferentes entre ellos, sugiriendo que los mecanismos por los cuales metabolizan ambos fosfonatos son diferentes. Esto coincide con los resultados bioinformáticos obtenidos anteriormente, demostrándose que la enzima PhnX involucrada en la degradación de 2AEP no participa en la degradación de glifosato, como ha sido demostrado por otros estudios (White y Metcalf, 2007). Esto puede confirmarse también por medio de las micrografías de las tinciones con DAPI, las cuales muestran la ausencia de polifosfato en las bacterias de la familia Bacillaceae estudiadas (Figura 15). El metabolismo de 2AEP

como fuente de fósforo no generó gránulos de polifosfato en las bacterias, por lo indica la incapacidad de emplear el Pi liberado en el medio como reservorio para la acumulación de Pi (Doruk *et al.*, 2013).

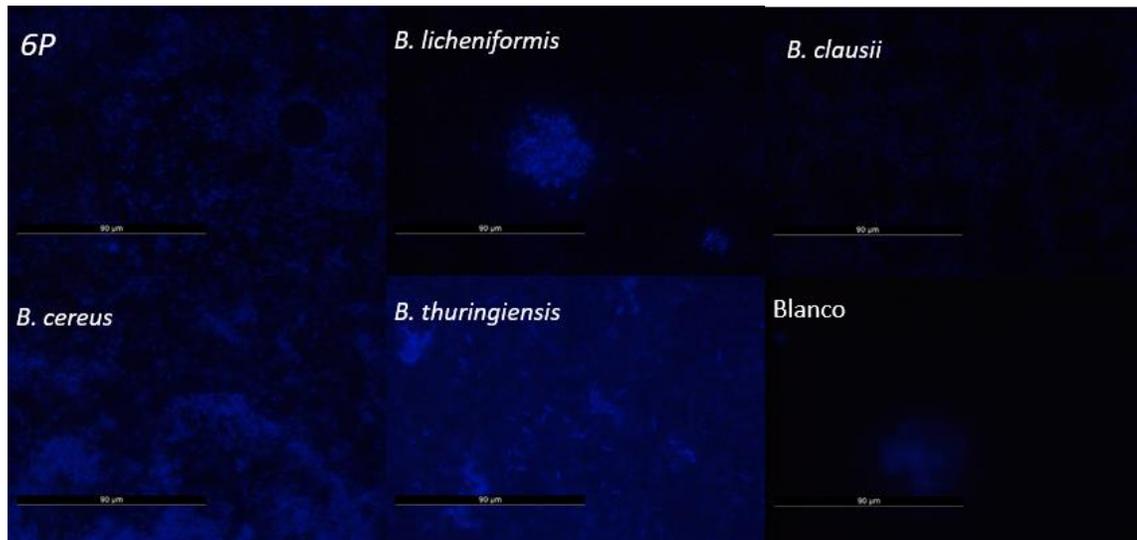


Figura 15. Tinción DAPI para identificación de Polifosfato en bacterias de la familia Bacillaceae utilizando 2AEP como única fuente de fósforo.

### **5.3 PARÁMETROS CINÉTICOS DEL METABOLISMO DEL GLIFOSATO SUMINISTRADO COMO ÚNICA FUENTE DE FÓSFORO POR LA BACTERIA *BACILLUS CEREUS* 6P**

Como puede observarse en la Figura 16, la degradación del glifosato en el cultivo experimental comenzó a las 100 h, observándose una liberación de Pi en el medio de cultivo debido al rompimiento del enlace C-P del glifosato.

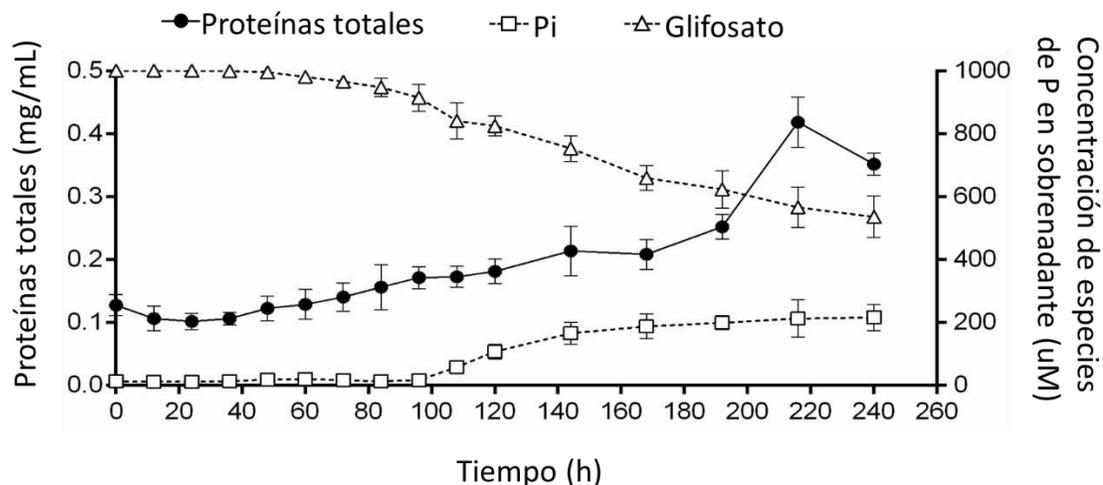


Figura 16. Cinética de biodegradación de glifosato suministrado como única fuente de fósforo llevada a cabo por la bacteria *Bacillus cereus* 6P.

Mientras tanto, las proteínas totales, indicador de crecimiento de biomasa del cultivo celular (Zubkov *et al.*, 1999), presentaron un incremento que coincide con la aparición de Pi en el medio. Esto sugiere que es alrededor de las 100 h, cuando *B. cereus* 6P comienza a degradar el glifosato mediante el rompimiento del enlace C-P, liberando el Pi que la bacteria emplea para su crecimiento celular. Estudios previos han demostrado que el Pi producto de la degradación del glifosato es empleado como fuente de fósforo por las bacterias (Zhan *et al.*, 2018).

González-Valenzuela y Dussán, (2018) han reportado la degradación de glifosato por bacterias de la familia Planococcaceae, donde comienza a disminuir la concentración de glifosato entre la hora 48 y 72, esto principalmente debido a que utilizan un cultivo pre-acondicionado, es decir que las bacterias se inoculan en medio con glifosato y se dejan incubar por dos días y posteriormente se utilizó ese cultivo para realizar los ensayos de biodegradación en un medio con glifosato nuevo.

Por lo tanto, el tiempo y el porcentaje de degradación de glifosato que se tiene con la bacteria *B. cereus* 6P, podría mejorarse acondicionando el cultivo y optimizando las condiciones del cultivo.

Las UFC/mL del cultivo de *B. cereus* 6P (Figura 17) muestran que la bacteria permanece en fase de adaptación durante las primeras 100 h de experimentación y posteriormente comienza su crecimiento, coincidiendo con lo observado con los resultados observados para las proteínas totales.

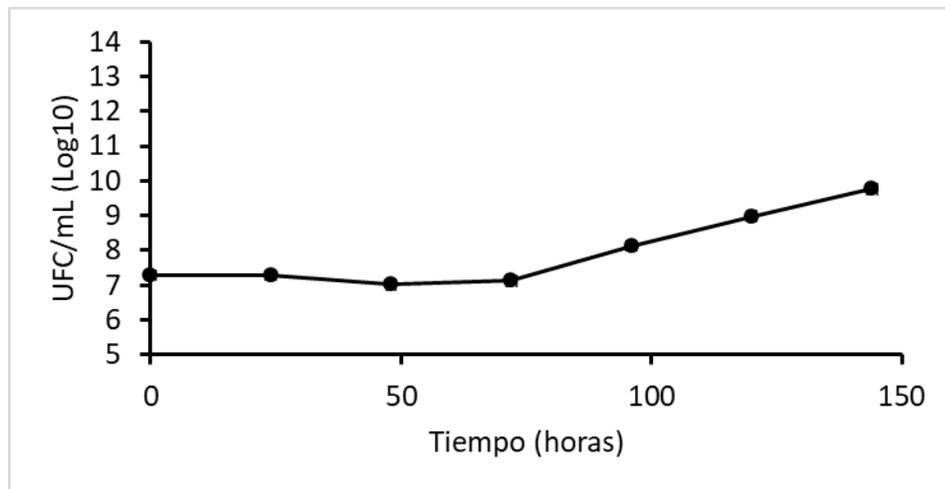


Figura 17. UFC de *Bacillus cereus* suministrando GPn como única fuente de fósforo.

La larga fase de adaptación presentada por *B. cereus* 6P en nuestra experimentación ha sido observada también por Benedict *et al.*, (1993), quienes observaron que cultivos de *B. cereus* cultivadas en medio de infusión cerebro-corazón bajo condiciones variables de temperatura (5 a 42 °C), concentración de sodio (0.5 al 5 %) y pH (4.5 al 7.5) pueden presentar fases de adaptación de hasta 136 h. Por lo tanto, puede suponerse que la adaptación de *B. cereus* 6P en el medio mineral mínimo suministrando glifosato como única fuente de fósforo es un fenómeno normal. Inclusive, podría asociarse a la disponibilidad de los nutrientes en el medio, como lo describen Valero, Fernández y

Salmerón, (2003) quienes de la misma manera, relacionan el tiempo de adaptación que en su caso fue de hasta 24 días, con las condiciones del medio.

Adicionalmente, tinciones con verde malaquita denotan la ausencia de esporas en el cultivo durante las primeras 100h de experimentación, reflejando que, durante este tiempo, la bacteria estaba en un proceso de adaptación a las condiciones del medio a fin de degradar el sustrato recalcitrante y comenzar a duplicarse. Schultz *et al.*, (2009) mencionan que la formación de esporas en diversos géneros de bacterias se da por falta de nutrientes o por daño en el DNA con el fin de resistir peligros como calor, radiación o resistir ante situaciones desfavorables para su reproducción. Además, dice que las esporulación no se inicia automáticamente ante una limitación de nutrientes, sino que, es el resultado final de una serie de pasos que podrían describirse como decisiones celulares sobre cómo enfrentar mejor el estrés.

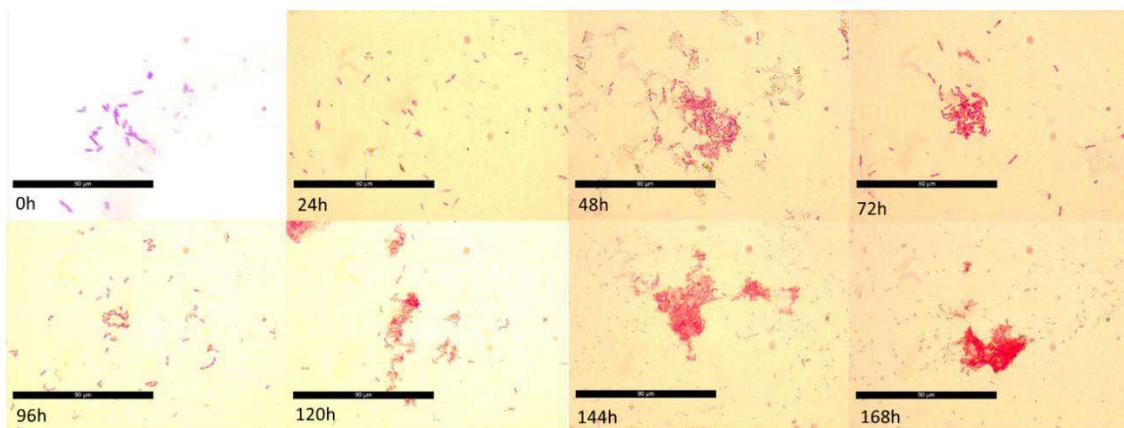


Figura 18. Tinción Verde Malaquita para visualización de esporas, en cultivo de *Bacillus cereus* 6P hasta las 168h.

Por el contrario, cuando la bacteria *B. cereus* 6P se cultivó en ausencia de fuente de fósforo, se presenciaron esporas desde las 72 h de experimentación (Figura 19).

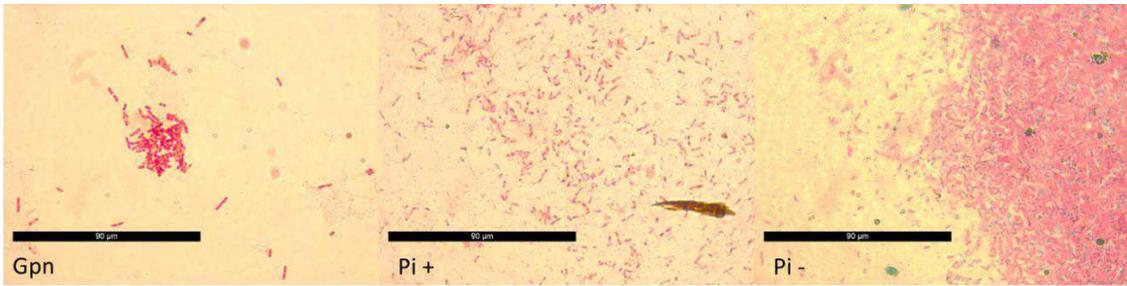


Figura 19. Tinción Verde Malaquita para visualización de esporas a las 72h. Glifosato como única fuente de fósforo: GPN.  $K_2HPO_4$  como única fuente de fósforo: Pi+. Sin fuente de fósforo: Pi-.

Mediante la combinación de estos resultados se sugiere que a partir de las 72 h se comienzan a producir las enzimas necesarias para la degradación del glifosato en *B. cereus* 6P. Como lo mencionan Hecker y Völker, (1998), ante la falta de una fuente de fósforo después de este periodo de incubación, las bacterias del género *Bacillus* comienzan su proceso de esporulación.

Por otra parte, la acumulación de polifosfato por *B. cereus* 6P (Figura 20) comienza a acumularse en el interior de la célula alrededor de las 100 h, hasta llegar a 3.5 mg/mL a las 240 h. Este periodo de acumulación coincide con la liberación de Pi en el medio de cultivo derivado de la ruptura del enlace C-P del glifosato.

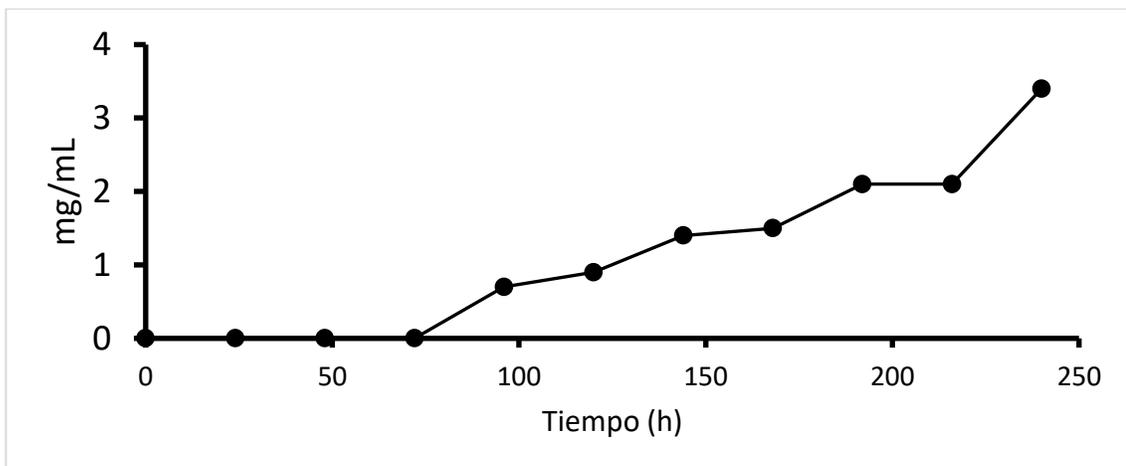


Figura 20. Cinética de acumulación de polifosfato empleando glifosato suministrado como única fuente de fósforo llevada a cabo por la bacteria *Bacillus cereus* 6P.

Diferentes estudios como los de Deinema *et al.*, (1980), han mencionado que las bacterias son capaces de acumular polifosfato en su interior. Sin embargo, las condiciones que favorecen esta acumulación difieren entre las diferentes bacterias. En este caso en particular, para la bacteria *B. cereus* 6P, la acumulación de polifosfato se logró debido a la liberación de fósforo al medio, como efecto directo del rompimiento del enlace C-P del glifosato, el cual, fue la única fuente de fósforo empleada. Del mismo modo, autores como Shi, Rao y Kornberg, (2004) reportaron la acumulación de polifosfato en *B. cereus* de hasta 100 nmol/mg proteína.

Para discernir si *Bacillus cereus* 6P cuenta con un mecanismo alternativo a la C-P liasa para la degradación del glifosato, se analizó la capacidad de esta bacteria para degradar fenilfosfonato y metilfosfonato, compuestos reportados como sustratos naturales de la C-P liasa. Como puede observarse en la Figura 21, *B. cereus* 6P presenta poco incremento en la cantidad de proteínas totales a lo largo del periodo de experimentación debido a la falta de una fuente accesible de Pi, demostrando su incapacidad para metabolizar estos fosfonatos (Kononova y Nesmeyanova, (2002).

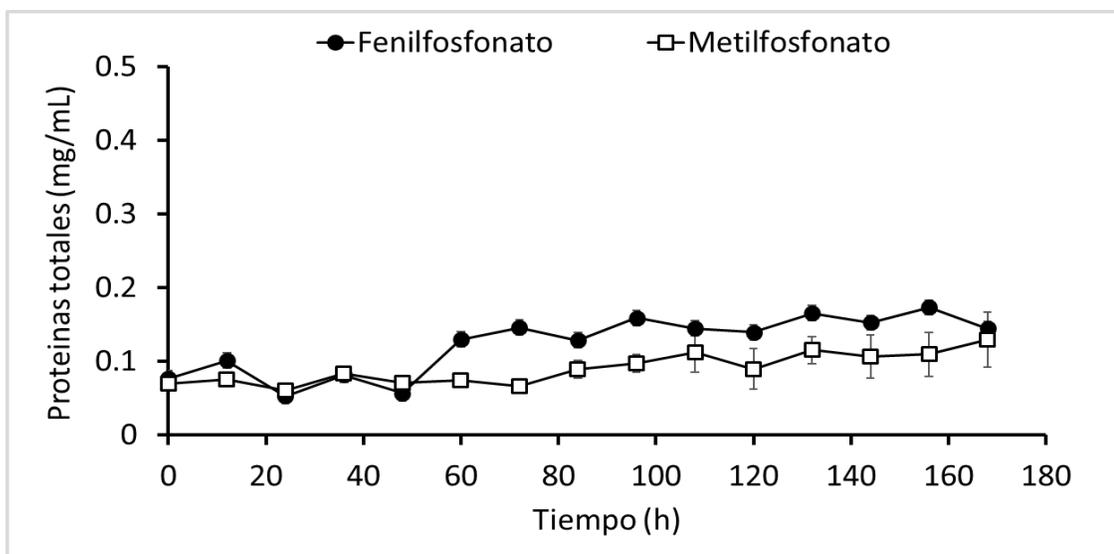


Figura 21. Cinética de biodegradación de fenilfosfonato y metilfosfonato llevada a cabo por la bacteria *Bacillus cereus* 6P.

Dado que la C-P liasa tiene como sustrato a distintos alquil-fosfonatos, entre ellos fenilfosfonato y metilfosfonato, se puede concluir que la cepa 6P no metaboliza al glifosato mediante la enzima C-P liasa Wackett *et al.*, (1987). Para ejemplificar esto, la Tabla 5 muestra una lista de microorganismos que han sido reportados por su capacidad de degradar glifosato, los cuales también fueron capaces de degradar metilfosfonato y fenilfosfonato sin excepción.

Tabla 5. Microorganismos degradadores de fosfonatos por la vía de la C-P liasa.

Modificada de Kononova y Nesmeyanova, (2002)

Microorganismo	Metilfosfonato	Fenilfosfonato	Glifosato
<i>Arthrobacter sp. GLP1</i>	✓	✓	✓
<i>Pseudomonas sp. PG2982</i>	✓	✓	✓
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	✓	✓	✓
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	✓	✓	✓
<i>Bacillus megaterium 2BLW</i>	✓	✓	✓
<i>Pseudomonas testosteroni</i>	✓	✗	✗
<i>Klebsiella oxytoca</i>	✓	✓	✗

#### 5.4 INDEPENDENCIA DE *BACILLUS CEREUS* 6P A LOS NIVELES DE FÓSFORO EN EL AMBIENTE PARA METABOLIZAR EL GLIFOSATO

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se realizaron cultivos de la bacteria 6P en medios que contenían  $K_2HPO_4$  y glifosato de manera conjunta con el propósito de evaluar la independencia del fósforo para la degradación de glifosato.

Como puede observarse en la Figura 22. la producción de biomasa donde se utilizó fosfato como única fuente de fósforo fue mayor, observándose una producción de biomasa de 1.37mg/mL. Por otro lado, en donde se utilizó glifosato, el incremento fue de 0.28 mg/mL y empleando glifosato suplementado con fosfato se tuvo un crecimiento

de 1.09 mg/mL. En cambio, al no añadir una fuente de fósforo, no se registró un incremento en la biomasa.

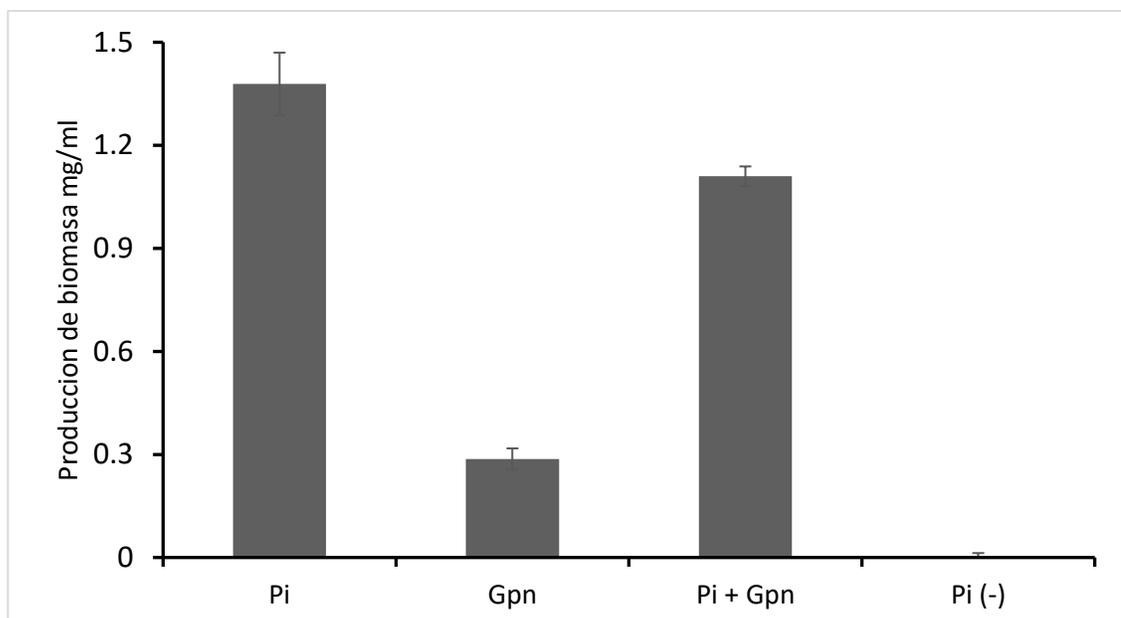


Figura 22. Producción de biomasa por *B. cereus* 6P, utilizando diferentes fuentes de fósforo.

Considerando estos resultados, se aprecia un suceso en donde el glifosato es empleado como fuente de fósforo para incrementar la biomasa por parte de *B. cereus* 6P a pesar de la presencia del fosfato en el medio. Tomando como evidencia el incremento de la biomasa cuando se utiliza glifosato suplementado con fosfato, pese a emplear solo la mitad de fosfato como se muestra en la Tabla 2.

En contraste con esto, Sviridov *et al.*, (2015); Zhan *et al.*, (2018) mencionaron que la degradación del glifosato en el suelo, bajo condiciones naturales, dependerá de la degradación por microorganismos y de mismo modo, esta degradación dependerá fuertemente de la concentración de fósforo exógeno y endógeno, por lo tanto usualmente solo se inducirá bajo condiciones de deficiencia de fósforo, lo cual ocurre muy raramente en la naturaleza.

Por esta razón, se considera factible la capacidad de *B. cereus* 6P de emplear glifosato como fuente de fósforo para incrementar la biomasa de manera independiente fosfato en el medio.

## 5.5 LOCALIZACIÓN DE LA POTENCIAL ENZIMA DEGRADADORA

Al realizar un fraccionamiento celular del cultivo de *B. cereus* 6P después de 120 h de experimentación frente a glifosato como única fuente de fósforo, la cuantificación del fósforo en las diferentes fracciones realizadas muestra que la degradación del glifosato se dio de mayor manera en la biomasa, reportándose una concentración final de 71  $\mu\text{M}$  (Figura 23). Por el contrario, en el sobrenadante no se detectó un incremento en las concentraciones de  $\text{P}_i$ , mientras que en la biomasa sonicada se incrementó 35  $\mu\text{M}$  de  $\text{P}_i$ . Debido a estos resultados la actividad enzimática se presume es en el contenido intracelular de la bacteria, descartando hasta el momento una actividad extracelular al relacionar la presencia de  $\text{P}_i$  como acto directo de la degradación del enlace C-P del glifosato.

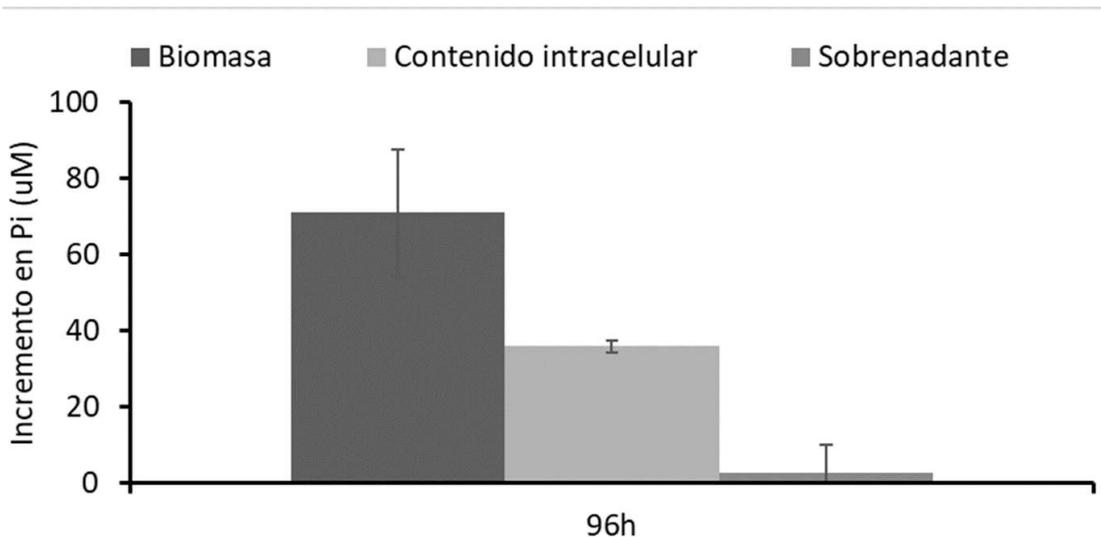


Figura 23. Liberación de  $\text{P}_i$  en las diferentes fracciones del cultivo de *Bacillus cereus* 6P a las 96 h.

La cuantificación del glifosato en estos experimentos demostró que en la fracción del sobrenadante no se observó ningún decremento en su concentración, por lo que se descartó nuevamente la actividad de una enzima extracelular. En contraste con esto, en la biomasa y la biomasa sonicada se detectó un decremento de glifosato, lo que coincide con la liberación de Pi al medio, es por esta razón que asociamos la actividad de degradación del glifosato con una enzima intracelular.

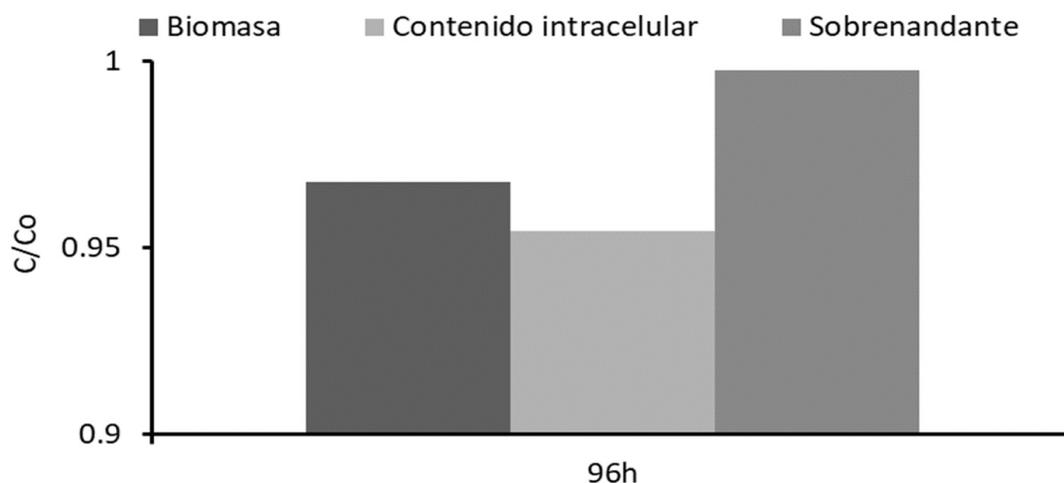


Figura 24. Concentración de GPn en las diferentes fracciones del cultivo de *Bacillus cereus* 6P a las 96 h

Al poseer actividad intracelular, la enzima degradadora *B. cereus* 6P, difiere completamente con la C-P liasa, la cual ha sido reportada como una enzima dependiente de la integridad de la membrana por diversos autores, como Hsieh y Wanner, (2010). Hove-Jensen, Zechel y Jochimsen, (2014). En vista a los resultados reportados en este trabajo, se trata de dos enzimas diferentes que comparten un mismo sustrato.

## 5.6 TOXICIDAD DEL RESIDUO DE DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO

A fin de estudiar la toxicidad del residuo de la biodegradación del glifosato se realizaron bioensayos de toxicidad aguda en lombrices de la especie *Eisenia foetida*. Con esto se pretende determinar los riesgos que generaría el proceso biotecnológico a una escala mayor.

Los resultados se muestran en la Figura 25, mostrándose que el peso de las lombrices no crece de manera homogénea durante la primera semana. Además, las lombrices que fueron suministradas con el producto de la degradación de glifosato presentaron mayor crecimiento que aquellas que fueron suministradas con glifosato comercial.

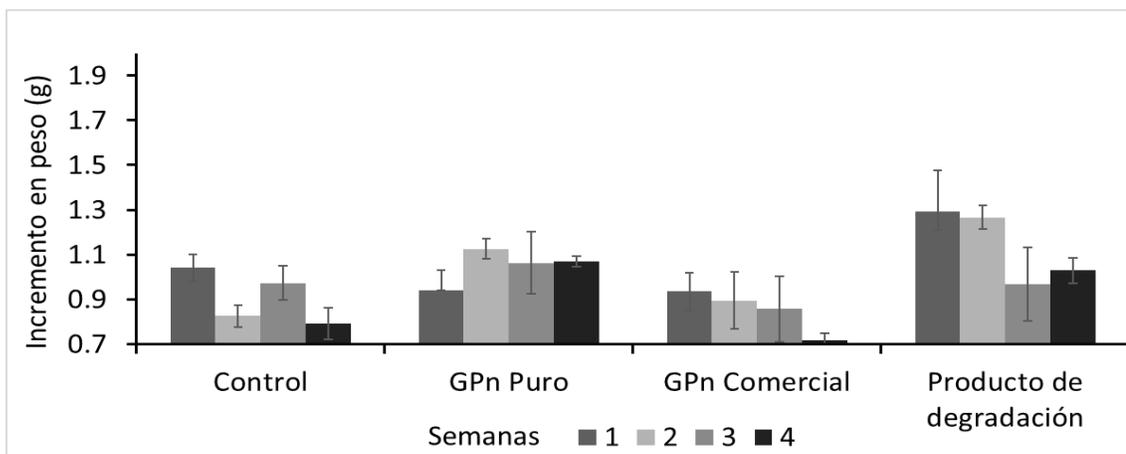


Figura 25. Incremento en peso de lombrices cultivadas bajo 4 condiciones: Agua (Control), GPn con glifosato comercial 3.38 ppm), GPn degradado (producto de degradación del glifosato grado reactivo), GPn reactivo (glifosato grado reactivo 3.38 ppm)

Durante la primera semana se observó una diferencia positiva de  $0.32 \pm 0.04$  g entre en ensayo con el producto de degradación del glifosato y las otras 3 condiciones. Continuando, en la segunda semana se mantuvo una diferencia positiva de  $0.31 \pm 0.127$  g entre el ensayo con el producto de degradación del glifosato y las otras 3 condiciones. Sin embargo, en la tercer y cuarta semana, el crecimiento en peso de las lombrices utilizando glifosato grado reactivo, registró un crecimiento de 0.06 g mayor al del producto de degradación del glifosato. Estos resultados son comparables con los reportados por Correia y Moreira, (2010) al observar una disminución en el crecimiento de la lombriz *Eisenia foetida*, sin presentar mortalidad, al emplear glifosato comercial (10 ppm).

Por otro lado, al utilizar glifosato grado reactivo (3.38 ppm) no se observó una disminución en el crecimiento en peso en la lombriz *Eisenia foetida*, por lo cual se

relaciona la pérdida de peso con los coadyuvantes presentes en el glifosato comercial, como lo menciona (Piola *et al.*, 2013) al atribuir la disminución del crecimiento a los “ingredientes inertes” como surfactantes, balanceadores, antiespumantes, entre otros, debido a una toxicidad intrínseca directa o a una potenciación del efecto del ingrediente activo (glifosato).

Para complementar esta información, en la Figura 26 se muestran los resultados del número de crías al término del bioensayo. En el control se observaron un promedio de 5 crías, mientras que al usar glifosato comercial (3.38 ppm) y glifosato grado reactivo (3.38 ppm) solo se observaron un promedio de 1.6 y 1 crías respectivamente. Lo que concuerda con lo mencionado por Correia y Moreira, (2010) al reportar 4 crías a los 28 días cuando no utilizó glifosato y 0 crías al utilizar 10 ppm de glifosato, por lo tanto, a pesar que el glifosato grado reactivo (3.38 ppm) no tuvo un efecto negativo en el incremento de peso como se vio en la Figura 25, si tiene un impacto negativo en la reproducción de la lombriz *Eisenia foetida* lo que produciría una reducción de su población a mediano plazo (Santadino, Coviella y Momo, 2014).

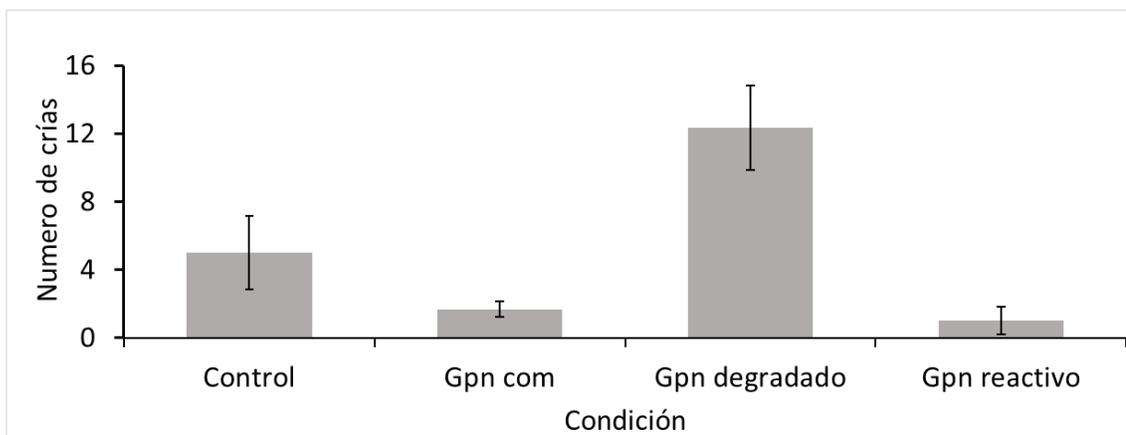


Figura 26. Numero de crías de lombrices cultivadas bajo 4 condiciones: Agua (Control), Gpn comercial (glifosato comercial 3.38 ppm), Gpn degradado (producto de degradación del glifosato grado reactivo), Gpn reactivo (glifosato grado reactivo 3.38 ppm)

Por otro lado, cuando se utilizó el producto de degradación de glifosato, se observó un mayor número de crías, alcanzando un promedio de 12.33, es decir aumentó el número

de crías en 146.66% con respecto al blanco. Por lo tanto, se demuestra la degradación del herbicida glifosato por la acción metabólica de *B. cereus* 6P al tener como evidencia la disminución de los efectos negativos del glifosato al presentar el mayor incremento en peso y al aumentar el número de crías de la lombriz *Eisenia foetida*.

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSIONES

Con los resultados experimentales y la discusión realizada se concluye que el método analítico utilizado por Waiman et al., (2011) es adecuado para la cuantificación de diferentes fosfonatos como glifosato, Ampa y 2AEP. La bacteria *B. cereus* 6P es la única bacteria de la familia Bacillaceae que tiene la capacidad de degradar el glifosato por una vía alternativa a la C-P liasa, rompiendo el enlace C-P, realizándolo de manera independiente a los niveles de fósforo en el medio. Teniendo como evidencia la disminución del glifosato, la aparición de Pi en el medio y la acumulación de polifosfato, a pesar de la ausencia del componente catalítico de la C-P liasa (PhnJ) demostrado *in-silico* y con la PCR dirigida al gen. Además, se demostró que la enzima PhnX no se ve involucrada, debido al comportamiento mostrado experimentalmente. También se sugiere que la enzima degradadora de *B. cereus* 6P, tiene actividad intracelular, por los resultados obtenidos con el fraccionamiento celular. Adicionalmente, con base en el análisis del residuo de la degradación del glifosato, se estableció que se disminuyen los efectos negativos del glifosato confirmando así su degradación.

## CAPITULO 7

### REFERENCIAS

- Benedict, R. C., Partridge, T., Wells, D. y Buchanan, R. L. (1993) “*Bacillus cereus*: Aerobic Growth Kinetics”, *Journal of Food Protection*, 56(3), pp. 211–214.
- Blattner, F. R., Burland, V. D., Plunkett, G., Sofia, H. J. y Daniels, D. L. (1993) “Analysis of the *Escherichia coli* genome. DNA sequence of the region from 89.2 to 92.8 minutes”, *Nucl. Acids Res.*, 21(12), pp. 5408–5417.
- Brunner, P. H. (2010) “Substance flow analysis as a decision support tool for phosphorus management.”, *Journal of Industrial Ecology*, 14(6), pp. 870–873.
- Cassigneul, A., Benoit, P., Bergheaud, V., Dumény, V., Etivant, V., Goubard, Y., Maylin, A., Justes, E. y Alletto, L. (2016) “Fate of glyphosate and degradates in cover crop residues and underlying soil: A laboratory study”, *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 545–546, pp. 582–590.
- Chen, C.-M., Ye, Q.-Z. y Zhu, Z. (1990) “Molecular biology of carbon-phosphorus bond cleavage”, *Journal of Biological Chemistry*, 265(8), pp. 4461–4471.
- Chen, M. X., Cao, Z. Y., Jiang, Y. y Zhu, Z. W. (2013) “Direct determination of glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*. Elsevier B.V., 1272, pp. 90–99.
- Cooper, J., Lombardi, R., Boardman, D. y Carliell-Marquet, C. (2011) “The future distribution and production of global phosphate rock reserves”, *Resources, Conservation and Recycling*. Elsevier B.V., 57, pp. 78–86.
- Correia, F. V. y Moreira, J. C. (2010) “Effects of glyphosate and 2,4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85(3), pp. 264–268.

- Deinema, M. H., Habets, L. H. A., Scholten, J., Turkstra, E. y Webers, H. A. A. M. (1980) "The Accumulation of Polyphosphate in *Acinetobacter* spp", 9, pp. 275–279.
- Doruk, T., Avican, U., Camci, I. Y. y Gedik, S. T. (2013) "Overexpression of polyphosphate kinase gene (*ppk*) increases bioinsecticide production by *Bacillus thuringiensis*", Microbiological Research. Elsevier GmbH., 168(4), pp. 199–203.
- Franz, J. E. (1974) "United States Patent Office". U.S. Disponible en: <https://patentimages.storage.googleapis.com/79/e0/7b/39edd677ce497f/US2602769>.
- Gilmour, M. W., Olson, A. B., Andrysiak, A. K., Ng, L. K. y Chui, L. (2007) "Sequence-based typing of genetic targets encoded outside of the O-antigen gene cluster is indicative of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroup lineages", Journal of Medical Microbiology, 56(5), pp. 620–628.
- Gomes, F. M., Carvalho, D. B., Peron, A. C., Saito, K., Miranda, K. y Machado, E. A. (2012) "Inorganic polyphosphates are stored in spherites within the midgut of *Anticarsia gemmatalis* and play a role in copper detoxification", Journal of Insect Physiology. Elsevier Ltd, 58(2), pp. 211–219.
- González-Valenzuela, L. E. y Dussán, J. (2018) "Molecular assessment of glyphosate-degradation pathway via sarcosine intermediate in *Lysinibacillus sphaericus*", Environmental Science and Pollution Research. Environmental Science and Pollution Research, pp. 1–7.
- Grandcoin, A., Piel, S. y Baures, E. (2017) "AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate", Water Research. Elsevier Ltd, p. 39.
- Guo, H., Wang, H., Zheng, J., Liu, W., Zhong, J. y Zhao, Q. (2018) "Sensitive and rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos and metabolites by UPLC–MS/MS using a modified Quick Polar Pesticides Extraction method", Forensic Science International. Elsevier Ireland Ltd, 283, pp. 111–117.

- Hecker, M. y Völker, U. (1998) "Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the  $\sigma(B)$  regulon", *Molecular Microbiology*, 29(5), pp. 1129–1136.
- Hove-Jensen, B., Zechel, D. L. y Jochimsen, B. (2014) "Utilization of Glyphosate as Phosphate Source: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(1), pp. 176–197.
- Hsieh, Y. J. y Wanner, B. L. (2010) "Global regulation by the seven-component Psignaling system", *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 13(2), pp. 198–203.
- Ibáñez, M., Pozo, Ó. J., Sancho, J. V., López, F. J. y Hernández, F. (2005) "Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 1081(2), pp. 145–155.
- International Agency for Research on Cancer (2015) "IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides", *Environmental Health*, 112(1), pp. 425–433.
- Kamat, S. S. y Raushel, F. M. (2013) "The enzymatic conversion of phosphonates to phosphate by bacteria", *Current Opinion in Chemical Biology*. Elsevier Ltd, 17(4), pp. 589–596.
- Kjær, J., Olsen, P., Ullum, M. y Grant, R. (2005) "Vadose zone processes and chemical transport leaching of glyphosate and amino-methylphosphonic acid from Danish agricultural field sites", *Journal of Environmental Quality*, 34, pp. 608–620.
- Kleps, R. A., Myers, T. C., Lipdus, R. N. y Henderson, T. O. (2007) "A sex-specific metabolite identified in a marine invertebrate utilizing phosphorus-31 nuclear magnetic resonance", *PLoS ONE*, 2(8).
- Kolpin, D. W., Thurman, E. M., Lee, E. A., Meyer, M. T., Furlong, E. T. y Glassmeyer, S. T. (2006) "Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States", *Science of the Total Environment*, 354(2–3), pp. 191–197.
- Kononova, S. V y Nesmeyanova, M. a (2002) "Phosphonates and their degradation by microorganisms.", *Biochemistry. Biokhimiia*, 67(2), pp. 184–195.

- Kulakova, A. N., Hobbs, D., Smithen, M., Pavlov, E., Gilbert, J. A., Quinn, J. P. y McGrath, J. W. (2011) "Direct quantification of inorganic polyphosphate in microbial cells using 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)", *Environmental Science and Technology*, 45(18), pp. 7799–7803.
- Liu, C. M., McLean, P. A., Sookdeo, C. C. y Cannon, F. C. (1991) "Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae", *Applied and environmental microbiology*, 57(6), pp. 1799–1804.
- Lo, C. A., Kays, I., Emran, F., Lin, T. J., Cvetkovska, V. y Chen, B. E. (2015) "Quantification of Protein Levels in Single Living Cells", *Cell Reports. The Authors*, 13(11), pp. 2634–2644.
- Martínez, A., Reyes, I. y Reyes, N. (2007) "Citotoxicidad del glifosato en células mononucleares de sangre periférica humana", *Biomédica*, 27, pp. 594–604.
- Metcalf, W. W. y Wanner, B. L. (1993) "Evidence for a fourteen-gene, *phnC* to *phnP* locus for phosphonate metabolism in *Escherichia coli*", *Gene*, 129, pp. 27–32.
- Moneke, a N., Okpala, G. N. y Anyanwu, C. U. (2010) "Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields", *African Journal of Biotechnology*, 9(26), pp. 4067–4074.
- Mörtl, M., Németh, G., Juracsek, J., Darvas, B., Kamp, L., Rubio, F. y Székács, A. (2013) "Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay", *Microchemical Journal. Elsevier B.V.*, 107, pp. 143–151.
- Pinto, E., Soares, A. G. y Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2018) "Quantitative analysis of glyphosate, glufosinate and AMPA in irrigation water by: In situ derivatization-dispersive liquid-liquid microextraction combined with UPLC-MS/MS", *Analytical Methods*, 10(5).
- Piola, L., Fuchs, J., Oneto, M. L., Basack, S., Kesten, E. y Casabé, N. (2013) "Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions", *Chemosphere*, 91(4), pp. 545–551.

- Pipke, R. y Amrhein, N. (1988) "Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752", *Applied and Environmental Microbiology*, 54(5), pp. 1293–1296.
- Quinn, J. P., Kulakova, A. N., Cooley, N. A. y McGrath, J. W. (2007) "New ways to break an old bond: The bacterial carbon-phosphorus hydrolases and their role in biogeochemical phosphorus cycling", *Environmental Microbiology*, 9(10), pp. 2392–2400.
- Rueppel, M. L., Brightwell, B. B., Schaefer, J. y Marvel, J. T. (1977) "Metabolism and Degradation of Glyphosate in Soil and Water", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(3), pp. 517–528.
- Santadino, M., Coviella, C. y Momo, F. (2014) "Glyphosate Sublethal Effects on the Population Dynamics of the Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826)", *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(12), p. 2207.
- Schowaneck, D. y Verstraete, W. (1990) "Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples", *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4), pp. 895–903.
- Schultz, D., Wolynes, P. G., Jacob, E. Ben y Onuchic, J. N. (2009) "Deciding fate in adverse times: Sporulation and competence in *Bacillus subtilis*", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), pp. 21027–21034.
- Shi, X., Rao, N. N. y Kornberg, A. (2004) "Inorganic polyphosphate in *Bacillus cereus*: Motility, biofilm formation, and sporulation", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(49), pp. 17061–17065.
- Shiba, T., Tsutsumi, K., Ishige, K. y Noguchi, T. (2000) "Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: their novel biological functions and applications.", *Biochemistry. Biokhimiia*, 65(3), pp. 315–23.
- Shinabarger, D. L. y Braymer, H. D. (1986) "Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG2982", *Journal of Bacteriology*, 168(2), pp. 702–707.

- Shinabarger, D. L., Schmitt, E. K., Braymer, H. D. y Larson, A. D. (1984) "Phosphonate utilization by the glyphosate-degrading *Pseudomonas sp.* strain PG2982", *Applied and Environmental Microbiology*, 48(5), pp. 1049–1050.
- Singh, B. K. y Walker, A. (2006) "Microbial degradation of organophosphorus compounds", *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), pp. 428–471.
- Smith, S. A. y Morrissey, J. H. (2007) "Sensitive fluorescence detection of polyphosphate in polyacrylamide gels using 4',6-diamidino-2-phenylindol", *Electrophoresis*, 28(19), pp. 3461–3465.
- Solomon, K., Anadón, A., Carrasquilla, G., Cerdeira, A., Marshall, J. y Sanin, L.-H. (2007) "Coca and poppy eradication in colombia: environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate", *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 190, pp. 1–182.
- Spurrier, E. C. (1973) "Glyphosate—a new broad-spectrum herbicide", *PANS Pest Articles and News Summaries*, 19(4), pp. 607–612.
- Van Stempvoort, D. R., Roy, J. W., Brown, S. J. y Bickerton, G. (2014) "Residues of the herbicide glyphosate in riparian groundwater in urban catchments", *Chemosphere. Elsevier Ltd*, 95, pp. 455–463.
- Sviridov, A. V, Shushkova, T. V, Ermakova, I. T., Ivanova, E. V, Epiktetov, D. O. y Leontievsky, A. A. (2015) "Microbial Degradation of Glyphosate Herbicides (Review)", *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(2), pp. 188–195.
- Talbot, H. W., Johnson, L. M. y Munneckew, D. M. (1984) "Glyphosate Utilization by *Pseudomonas sp.* and *Alcaligenes sp.* Isolated from Environmental Sources", I, pp. 255–259.
- Terman, N. y Quinn, J. (1998) "Phosphate starvation-independent 2-aminoethylphosphonic acid biodegradation in a newly isolated strain of *Pseudomonas putida*", *systematic and applied microbiology*, 21, pp. 36–352.
- Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T. y Satayavivad, J. (2013) "Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors", *Food and Chemical Toxicology. Elsevier Ltd*, 59, pp. 129–136.

- Torstensson, N. T. L. y Aamisepp, A. (1977) "Detoxification of glyphosate in soil", *Weed Research*, 17, pp. 209–212.
- US Environmental Protection Agency (2016) "Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential EPA's Office of Pesticide Programs", EPA's Office of Pesticide Programs, p. 227.
- Valero, M., Fernández, P. S. y Salmerón, M. C. (2003) "Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates.", *International journal of food microbiology*, 82(1), pp. 71–9.
- Villarreal-chiu, J. F. y Acosta-cortés, A. G. (2017) "Green Technologies and Environmental Sustainability", Springer International Publishing, pp. 179–201.
- Villarreal-Chiu, J. F., Quinn, J. P. y McGrath, J. W. (2012) "The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment", *Frontiers in Microbiology*, 3(19), pp. 1–13.
- Wackett, L. P., Shames, S. L., Venditti, C. P. y Walsh, C. T. (1987) "Bacterial carbon-phosphorus lyase: Products, rates, and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism", *Journal of Bacteriology*, 169(2), pp. 710–717.
- Waiman, C. V., Avena, M. J., Garrido, M., Fernández Band, B. y Zanini, G. P. (2012) "A simple and rapid spectrophotometric method to quantify the herbicide glyphosate in aqueous media. Application to adsorption isotherms on soils and goethite", *Geoderma*. Elsevier B.V., 170, pp. 154–158.
- Wang, S., Seiwert, B., Kästner, M., Miltner, A., Schäffer, A., Reemtsma, T., Yang, Q. y Nowak, K. M. (2016) "(Bio)degradation of glyphosate in water-sediment microcosms - A stable isotope co-labeling approach", *Water Research*, 99, pp. 91–100.
- Wang, Y., Zhang, R., Li, J., Wu, Z., Yin, W., Schwarz, S., Tyrrell, J. M., Zheng, Y., Wang, S., Shen, Z., Liu, Z., Liu, J., Lei, L., Li, M., Zhang, Q., Wu, C., Zhang, Q., Wu, Y., Walsh, T. R. y Shen, J. (2017) "Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production", *Nature Microbiology*. Nature Publishing Group, 2(February).

- Wanner, B. L. (1994) "Molecular genetics of carbon-phosphorus bond cleavage in bacteria", *Biodegradation*, 5(3–4), pp. 175–184.
- White, A. K. y Metcalf, W. W. (2007) "Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds", *Annual review of microbiology*, 61, pp. 379–400.
- Zhan, H., Feng, Y., Fan, X. y Chen, S. (2018) "Recent advances in glyphosate biodegradation", *Applied Microbiology and Biotechnology*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(12), pp. 5033–5043.
- Zubkov, M. V., Fuchs, B. M., Eilers, H., Burkill, P. H. y Amann, R. (1999) "Determination of total protein content of bacterial cells by SYPRO staining and flow cytometry", *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), pp. 3251–3257.

## ANEXOS

### Anexo 1: Reactivos utilizados

Nombre del reactivo	Marca
NaOH	Desarrollo de especialidades
Triclorometano 1L	Baker
Biomolgreen	Enzo
Bradford	Sigma
Ácido tricloro acético	CTR
NaCl 500g	Especialidades químicas
KI 500g	Fermont
Glifosato 5g	Sigma-Aldrich
Metilfosfonato	Sigma-Aldrich
Fenilfosfonato	Sigma-Aldrich
Fosfonoacetato	Sigma-Aldrich
Colorante Verde Malaquita	Merk
Colorante Safranina	Merk
Colorante Cristal Violeta	Merk
Colorante Marrón Bismark	Merk
Iodo	Baker
Azul de Metileno	Merk
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 500g	Desarrollo de especialidades
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> 500g	Desarrollo de especialidades
NH <sub>4</sub> Cl 500g	Desarrollo de especialidades
Cloruro de Fmoc 5g	Sigma-Aldrich
Medio LB 250g	Difco
Agar bacteriológico	BD Bioxon
Vitaminas	Desarrollo de especialidades
Fe	Sigma-Aldrich
Ácido Sulfúrico	Jalmek
EDTA	Baker
Ácido acético glacial	Desarrollo de especialidades

<b>Tris buffer</b>	Baker
<b>KOH</b>	Desarrollo de especialidades
<b>KCl 500g</b>	Desarrollo de especialidades
<b>Tetraborato de sodio decahidratado 500 g</b>	Sigma-Aldrich
<b>Acetonitrilo 1L</b>	Baker
<b>Metanol</b>	Baker
<b>Caldo nutritivo 500g</b>	BD Bioxon

## Anexo 2: Equipos utilizados

<b>Nombre del equipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
<b>Autoclave automática</b>	Tuttnauer	2540M
<b>Balanza analítica</b>	Ohaus	Pas12
<b>Balanza Analítica</b>	AND	Ltr200
<b>Baño de agua</b>	Poly Science	WA02A11B
<b>Baño de ultrasonido</b>	Branson	1510R- DTH
<b>Campana de bioseguridad clase II</b>	LABCONCO	36204
<b>Centrifuga refrigerada</b>	Thermoelectron	Centra CL3
<b>Espectrofotómetro UV-vis</b>	Varian	Cury 50
<b>Espectrofotómetro UV-vis</b>	Spectronic	4001/4
<b>Horno de Secado</b>	Labline	3513
<b>Incubadora con agitación</b>	Shel lab	1575
<b>Microcentrifuga</b>	Eppendorf	Centrifuge 5415 D
<b>Microscopio de Fluorescencia</b>	Leica	DM3000
<b>Plancha de calentamiento c/agitación</b>	Thermo Scientific	Sp131325
<b>Sonicador</b>	Fisher Scientific	FB120
<b>Vortex (Agitador para tubos)</b>	Lab line	1195
<b>Termociclador</b>	Techne	3Prime