



ESTUDIO DE *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y
Bacillus thuringiensis kurstaki HD-1 EN RELACIÓN A ESTRÉS: XENOBIÓTICOS Y
GLIFOSATO

María Angie Beltrán Duque

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá, mayo 2020



ESTUDIO DE *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y
Bacillus thuringiensis kurstaki HD-1 EN RELACIÓN A ESTRÉS: XENOBIÓTICOS Y
GLIFOSATO

María Angie Beltrán Duque

Orientador Externo

Silvio Alejandro López Pazos Ph.D.

Orientadora interna

Sandra Mónica Estupiñán Torres M.Sc.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá, mayo 2020

A Dios por ser mi guía y fortaleza diaria; a mi madre por todo el amor, esfuerzo, dedicación, apoyo y paciencia y a mi hermano por su amor incondicional.

“La educación es el arma más poderosa que puedes usar para cambiar el mundo”- Nelson Mandela

Agradecimientos

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y al programa de Bacteriología y Laboratorio clínico por la formación recibida.

Al doctor Silvio Alejandro López Pazos, docente de la Universidad Antonio Nariño por brindarme la oportunidad y confianza de realizar esta investigación, agradeciendo su paciencia, dedicación, enseñanza, motivación y acompañamiento continuo.

A la doctora Sandra Mónica Estupiñan, docente de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por su asesoría y acompañamiento en este trabajo de grado.

A la doctora Diana Daniela Portela Dussán, investigadora del grupo de investigación Ingeniería Genética de Plantas de la Universidad Nacional por su colaboración, enseñanza y orientación.

A mis compañeros del grupo de investigación de la Universidad Antonio Nariño por su colaboración y amabilidad.

Tabla de contenido	Pág.
1. Título.....	11
2. Resumen.....	11
3. Introducción	12
4. Objetivos	14
5. Marco teórico	15
5.1 Antecedentes	15
5.3 <i>Pseudomonas extremaustralis</i>	24
5.4 <i>Bacillus subtilis</i>	25
5.5 <i>Bacillus thuringiensis</i>	25
5.6 Proteínas hipotéticas	25
5.7 Xenobióticos en la agricultura.	26
5.7.1 Características generales del glifosato	27
5.7.1.1 Propiedades fisicoquímicas del glifosato	27
5.7.1.2 Mecanismos de acción	28
5.8 Biorremediación por <i>Pseudomonas extremaustralis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
5.9 Proteínas de shock térmico	30
6 Metodología	32
6.1 Tipo de investigación.....	32
6.2 Universo, población y muestra.....	32
Universo.....	32
Población	32
Muestra	32
6.3. Variables	32
Variables independientes	32
Variables dependientes	32
6.4. Hipótesis	33

Hipótesis nula.....	33
Hipótesis alterna.....	33
6.5. Indicadores.....	33
6.6. Técnicas y procedimientos.....	33
7 Resultados.....	36
8. Discusión.....	44
9 Conclusiones.....	56
10. Bibliografía.....	58

Lista de figuras
Pág.

Figura 1. Estructura del glifosato..... 27

Figura 2. Crecimiento de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 en medio mínimo mineral. 38

Figura 3. Método de difusión disco-placa realizado a las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1. 40

Figura 4. Método de sensibilidad antimicrobiana - Método de macrodilución en caldo realizado a las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1. ... 41

Figura 5. Crecimiento de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 en agar Tripticasa Soya más el antibiótico..... 42

Figura 6. Cuantificación de proteínas. 43

Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. 44

Figura 9. Metabolismo bacteriano del glifosato a través de la vía AMPA catalizada por la enzima GOX..... 48

Figura 10. Metabolismo bacteriano del glifosato a través de la vía AMPA catalizada por la enzima GO..... 49

Figura 11. Metabolismo bacteriano del glifosato a través de la vía C-P liasa catalizada por la enzima C-P liasa. 51

Figura 12. Ubicación y organización propuesta de los polipéptidos codificados en el operón phn 52

Lista de tablas	Pág.
Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del glifosato	27
Tabla 2. Enzimas que participan en la biorremediación y sus funciones.....	29
Tabla 3. Sales del medio selectivo sólido donde el glifosato es utilizado como fuente de carbón	34
Tabla 4. Proteínas hipotéticas de las cepas <i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515, <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 y <i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD-1 relacionadas con degradación de xenobióticos.	36
Tabla 5. Identificación de enzimas involucradas en las vías de degradación del glifosato presentes en el genoma de <i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515, <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 y <i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD-1.....	38
Tabla 6. Concentraciones patrones de Albumina.....	43
Tabla 7. Concentraciones de proteínas totales de <i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515, <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 y <i>B. thuringiensis</i> HD-1.....	43

1 TÍTULO

ESTUDIO DE *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 EN RELACIÓN A ESTRÉS: XENOBIÓTICOS Y GLIFOSATO

2 RESUMEN

Los xenobióticos son compuestos químicos no son naturales como fertilizantes, pesticidas, tintes, dioxinas, bifenilos policlorados o hidrocarburos poliaromáticos; contaminantes, afectan a los seres vivos porque no hacen parte de rutas metabólicas celulares, y son recalcitrantes. En la agricultura se usan xenobióticos como aldrin, dieldrina, endrina, Clordano, Heptacloro-Hexaclorobenceno, glifosato y DDT. Algunos microorganismos capaces de degradar xenobióticos son especies de *Pseudomonas* y *Bacillus* con potencial para biodegradación y biorremediación. *P. extremaustralis*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis* poseen enzimas de uso biotecnológico. Hasta el 50% de las proteínas de su genoma se consideran hipotéticas de función desconocida, que pueden desempeñar funciones en procesos de adaptación. Este trabajo tiene como objetivo reconocer la posible presencia de proteínas de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 que se expresan en condiciones de estrés, incluyendo degradación de xenobióticos. Haciendo uso de tBLASTn ($E < 8e-17$ / identidad $>40\%$ /cobertura $>83\%$) se determinaron enzimas relacionadas con degradación de compuestos xenobióticos, igual que las enzimas glifosato oxidorreductasa o glicina oxidasa involucradas en la vía AMPA y la enzima fosfatasa específica C-P liasa las cuales están asociadas a la capacidad de tomar glifosato como única fuente de carbono o fosforo respectivamente. Las cepas se sometieron a estrés mediado por antibióticos para determinar la posible síntesis de proteínas de choque térmico GroEL/ES identificándose la posible síntesis de GroES (10 kDa). Este trabajo permite comprender mejor mecanismos por los cuales las bacterias se adaptan a ambientes de estrés y permiten identificar su potencial para Biotecnología ambiental.

Palabras clave: *Pseudomonas extremaustralis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*, xenobiótico, proteína hipotética, proteína de choque térmico

María Angie Beltrán Duque

Silvio Alejandro López Pazos Ph.D. - Orientador Externo

Sandra Mónica Estupiñán Torres M.Sc. - Orientadora interna

3 INTRODUCCIÓN

A los compuestos sintéticos químicos que no son naturales y vienen de fuentes externas al ambiente, se llaman xenobióticos, los cuales pueden ser fertilizantes químicos, pesticidas, tintes, dioxinas, bifenilos policlorados (PCB), e hidrocarburos poliaromáticos que generan efectos secundarios sobre la biota, puesto que no pueden ser reconocidos por los procesos bioquímicos en plantas y microorganismos, haciéndolos resistentes a la degradación (1). Para los años 70's, en Colombia se hizo uso de plaguicidas con contaminantes orgánicos persistentes (COP), como aldrin, dieldrina, endrina, Clordano, Heptacloro-Hexaclorobenceno, Mirex, Toxafeno y DDT para cultivos como el maíz, arroz, papa, y algodón, los cuales pueden estar en el suelo por años (2). En las regiones agrícolas de Colombia, como la Caribe y Pacífica, los cultivos de banano, arroz, pastos, algodón, maíz y frutales generan residuos de pesticidas que son lixiviados a los ríos Magdalena y al Cauca, lo que ocasiona contaminación persistente del compuesto orgánico (3). Según la estadística de “Comercialización de plaguicidas químicos de uso agrícola 2013- ICA”, los cinco plaguicidas más consumidos en Colombia son el fungicida Mancozeb (20.379 ton), los herbicidas 2,4 Diclorofenoxiacético (12.797 ton) y glifosato (9.605 ton); y los insecticidas imidacloprid (5920 ton) y clorpirifos (4421 ton), siendo estos causantes de contaminación del suelo generando infertilidad y toxicidad debido a su bioacumulación (4).

Existe una variedad de microorganismos capaces de degradar compuestos xenobióticos agrícolas, algunos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas sp* y *Bacillus sp* (5). Los microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas sp*, son bacilos Gram negativos y generalmente móviles, se adaptan a diferentes condiciones ambientales, que para otros microorganismos serían desfavorables para su crecimiento. Lo anterior, gracias a su actividad enzimática e información genética, confirmando así que este grupo de microorganismo son promotores de la biodegradación y biorremediación (5). *B. subtilis* y *B. thuringiensis* son bacilos Gram positivos, un sistema modelo para diferenciación y desarrollo celular (6) (7) Su interacción directa con el ambiente se produce gracias a producción de enzimas que degradan sustratos derivados de la fauna, flora y compuestos orgánicos como hidrocarburos (6) (7). Por medio de la degradación microbiana, el glifosato puede ser usado como fuente de C por medio de la vía ácido aminometilfosfónico (AMPA). También el glifosato puede ser usado como fuente de fósforo, gracias al sistema enzimático de la vía C-P liasa (8).

Las proteínas son moléculas que cumplen funciones específicas, incluyendo biorremediación enzimática (9). Cuando se habla de proteínas hipotéticas, se define como una proteína que al parecer se expresa a partir de un marco de lectura abierto, pero no hay evidencia experimental de su traducción, es por lo anterior que no ha sido caracterizada, pero es probable que alguna de estas proteínas hipotéticas puedan realizar funciones biológicas que aún no se conocen, utilizando métodos de predicción funcional se busca la presencia de señales de orientación subcelular y la presencia de dominios caracterizados (9) (10). Los dominios de función desconocida (DUF), son un gran conjunto de familias que no incluyen ninguna proteína de función conocida, y no se sabe si estas familias representan un dominio de proteínas o muchos (11). Una de las formas para determinar la función de un dominio no caracterizado, es identificar la similitud con un dominio de función conocida por comparación de secuencias o por análisis estructural; otra forma es el uso del contexto genómico para identificar computacionalmente la función por medio de bases de datos como Pfam (12) y SUPERFAMILY 1.75 (13); y por último por biología molecular o bioquímica (11). Las proteínas huérfanas son enzimas que no tienen una proteína o secuencia de genes coincidentes (14). Los genes se pueden asociar por la proximidad de los mismos en el genoma, donde los procariotas tienen genes organizados en operones, también se pueden transcribir la proteína desde la región promotora (14).

Cuando las bacterias se encuentran expuestas a un estrés ambiental puede ocurrir la expresión de las proteínas de choque térmico, las cuales están encargadas de mediar el plegamiento de las cadenas polipeptídicas, previniendo la agregación de polipéptidos (15). El sistema de chaperonina GroEL/GroES es quizá uno de los sistemas de chaperona más estudiados a nivel del mecanismo molecular, tenido un peso de 60 kDa y el cofactor 10 kDa (16).

Por lo anterior, el presente trabajo responderá a la siguiente pregunta problema: ¿Cuáles son las posibles funciones de proteínas de *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 relacionadas con estrés?

4 OBJETIVOS

General:

Reconocer la posible presencia de las proteínas de *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 relacionadas con estrés.

Específicos

- ✓ Identificar proteínas hipotéticas de *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 para la degradación de xenobióticos.
- ✓ Establecer la capacidad de *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 para la degradación de glifosato.
- ✓ Determinar la posible presencia de proteínas de choque térmico relacionadas con estrés de *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1.

5 MARCO TEÓRICO

Las concentraciones de xenobióticos en el suelo, pueden causar la bioacumulación cuando este compuesto pasa a través de la cadena alimentaria de un nivel trófico a otro. En las plantas se absorbe por raíz y pueden bloquear procesos bioquímicos como el transporte de iones, nutrientes, inactivar enzimas, alterar la integridad de la membrana celular y de los orgánulos (1). La transformación biológica de los compuestos orgánicos por microorganismos, es llevada a cabo gracias a diferentes tipos de enzimas y ácidos orgánicos que actúan sobre los compuestos xenobióticos y los degradan en formas más simples. Algunas bacterias del género *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.*, tienen la capacidad de cumplir una función degradadora de xenobióticos incluyendo compuestos aromáticos policíclicos, fertilizantes y pesticidas (1).

Las proteínas tienen diferentes funciones, ya sean enzimáticas, de transporte o estructurales, las cuales son un producto genético que interactúa para promover la función estructural y el crecimiento celular (9). Dentro de la secuenciación de genomas de organismos, hasta el 50% de los genes dentro de un genoma se denominan como “hipotéticos” o “desconocidos” (9), situación que limita la comprensión del papel que pueden desempeñar estas proteínas hipotéticas en la supervivencia y en relación con las diferentes condiciones medio ambientales (17). Se debe tener en cuenta que cuando la bacteria se encuentra expuesta a un estrés ambiental puede expresar proteínas de choque térmico, las cuales previenen la agregación de polipéptidos ya que se encargan de mediar su plegamiento (15). Específicamente para *P. extremaustralis*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*, algunas de estas proteínas podrían ser la respuesta al estrés por xenobióticos.

5.1 Antecedentes

Las investigaciones en suelos polares, evidencia que el derrame de un hidrocarburo aumenta el número de bacterias biorremediadoras, incluyendo al género *Pseudomonas sp.* La tasa de degradación de hidrocarburos *in situ* es lenta debido a su persistencia, tales como alcanos ligeros y aromáticos que se encuentren en el subsuelo, los cuales no están expuestos a la evaporación y fotooxidación; de manera que la actividad de bacterias autóctona es limitada para los degradadores de hidrocarburos, ya que las condiciones ambientales como la temperatura baja o fluctuante, la alcalinidad, la humedad, la limitación de nutrientes y la inhibición ejercida por el hidrocarburo, son desfavorables (18). La temperatura es una condición ambiental que influye en la biorremediación, a una temperatura baja aumenta la

viscosidad del aceite y la volatilización del compuesto lo que produce un aumento del tiempo para la degradación del hidrocarburo, sin indicar un cese de la actividad biodegradadora incluso a temperaturas bajo cero (18). En relación con las condiciones ambientales se considera que el nitrógeno es el principal nutriente limitante, puesto que para la degradación de hidrocarburos se dispone del nitrógeno (N) y fósforo (P) que se encuentren en el medio, evidenciándose en *P. putida*, *Acinetobacter sp.* y *Rhodococcus sp.*, las cuales tuvieron la capacidad de crecer en una gama de alcanos a partir de hexano (6C) a través de eicosano (20 C) y pristano compuesto isoprenoide (2,6,10,14-tetrametil-entadecan). El nivel óptimo de N para la biodegradación del hidrocarburo depende del tipo de suelo (18). Los genes homólogos de *P. putida* (*Pp alkB*), *Acinetobacter sp.* (*Ac alkM*) y *Rhodococcus sp.* (*Rh alkB1* y *Rh alkB2*) codifican el sistema hidroxilasa alcano que comprende una monooxigenasa alcano-integral de membrana y rubredoxina soluble y rubredoxina reductasa los cuales están involucrados en la biodegradación del hidrocarburo (18).

Javaid et al. (19) señalan que *Pseudomonas sp.* puede degradar endosulfán utilizando un medio modificado con glucosa y atrazina, tomándolos como fuente de carbono (C) (19). El endosulfán se metaboliza en sulfato de endosulfán, que es el único producto del metabolismo del endosulfán por acción bacteriana, donde el endosulfán logró degradarse en 50% a los tres días, gracias a que las enzimas para la degradación de pesticidas organoclorados son principalmente enzimas de deshidrocloración, enzimas hidrolíticas y deshidrogenasas, las cuales están relacionadas con los genes de la familia *Lin* (19).

En Australia, se realizó un muestreo de cinco granjas de caña de azúcar con un antecedente de utilizar pesticida clorpirifos (CP) (20). Se utilizó el medio MSM complementado con clorpirifos 20 mg/L y modificado con N, P y C, se obtuvo como resultado que *Pseudomonas sp.* tuvo mayor degradación en los medios de MSM sin C (+ N/ + P /- C) en el cual utilizo 90% de clorpirifos (20).

El género *Pseudomonas sp.*, fue descrito por primera vez por Migula en 1894 (21). *P. extremaustralis*, es una bacteria aislada del extremo sur de la Antártida, es un bacilo Gram negativo, no formador de esporas, móvil, con metabolismo oxidativo evidenciado en oxidasa y catalasa positivo (21). Su crecimiento se da a una temperatura de 4 a 37°C, con morfología circular, lisa y no pigmentada (21).

Las observaciones relacionadas con la biorremediación de hidrocarburos, indican que se necesitan microorganismos con una actividad enzimática que les permita adaptarse a la condición adversa de contaminación y así sobrevivir (22). Es por lo anterior que la supervivencia de *P. extremaustralis* está asociada a la producción de polihidroxialcanoatos

(PHAs) cuando se encuentra en exposición a hidrocarburos (22). En el bioensayo realizado se encontró que *P. extremaustralis* crece en medio MSM con 5% de diesel ($C_{10}H_{20}$) asociándose este crecimiento a la presencia del gen *AlkB* que codifica para monooxigenasa, degradando $27.3 \pm 6.0\%$ de diésel (22).

Cabe resaltar que metabolizar compuestos aromáticos por parte de microorganismos está relacionado con entornos pobres en nutrientes (22). La degradación de compuestos complejos está ligado con el metabolismo del ácido ferúlico, el cual es uno de los ácidos hidroxicinámicos más comunes presentes en la lignina, donde *P. extremaustralis* presenta todos los genes de la ruta para el metabolismo del ácido ferúlico en el cual los genes de porina específica para el hidroxicinamato (*orpD*) y transportador de hidroxicinamato (*mhpT*) son claves para la captación de derivados del ácido cinámico, observados solo en *P. extremaustralis*, *P. fluorescens* SBW25 y *P. syringae* pv. *syringae* B782a (22). Además, una segunda copia de *orpD* solo se encontró en *P. extremaustralis*. Para la conversión de ácido ferúlico en ácido vanílico en el género *Pseudomonas* sp. se han descrito dos vías, en donde una de estas vías transforma el feruloilCoA en ácido vanílico mediante una acil-CoA-deshidrogenasa y una enzima b-cetotiolasa, y la segunda vía tiene la vanilina como intermediario que conduce al ácido vanílico por la enzima Vanilin deshidrogenasa, ambas rutas se encontraron en *P. extremaustralis* (22).

Las especies de *Pseudomonas* sp. son metabólicamente versátiles y se puede obtener energía de diferentes vías centrales y secundarias, como la ruta Entner-Doudoroff, la oxidación periplasmática de la glucosa (que involucra a los genes *gcd* y *gad*), la oxidación del etanol (incluidos los genes *exaA*, *exaB* y *exaC*), la fermentación de piruvato (incluyendo *ack*, *pta*, *adhA* y *ldhA*) y arginina (incluyendo los genes *ldhA* y *arcDABC*) (23). En este estudio para determinar la capacidad de *P. extremaustralis* para crecer utilizando etanol como fuente de C se llevó a cabo en agar LB, previamente modificado con etanol al 0.5% (v/v) para acumular así PHA y para estimar cuantitativamente la actividad del alcohol deshidrogenasa se utilizó el ensayo de p-rosanilina, y se determinó el espectro de absorción (23). Los genes involucrados en el metabolismo de oxidación del etanol son genes *exaA* que codifica un etanol deshidrogenasa dependiente de una quinona pirroloquinolina (PQQ), *exaC* que codifica la enzima aldehído deshidrogenasa, y *exaB* codifica c550 citocromo, así como *erbR* que expresa un regulador transcripcional relacionado con oxidación el etanol en el género *Pseudomonas* sp. En *P. extremaustralis* las secuencias de aminoácidos de *ExaA1* y *ExaA2* presentaron entre ellas el 51% de identidad y el 78% de similitud (23). El gen de codificación

erbR se encuentra en la misma zona genómica que *exaA*, *exaB* y *exaC*, separados por nueve ORFs putativos (23).

López et al. (24) realizaron un análisis experimental para determinar la actividad lipolítica de *P. extremaustralis* USBA-GBX-515 (ID CMPUJ U515), evaluando el crecimiento en trioleína, tributirina, Tween 80, aceite de oliva y tricaprilina, usándolos como fuente de C durante 42 horas a 30°C. Se determinó la actividad lipolítica máxima 2.0 UL $\mu\text{mol/L/min}$ a las 15 horas al final de la fase exponencial (24). El análisis genómico identificó dos genes; uno de ellos es *lip515A* relacionado con una lipasa de triacilglicerol, y *est515A* una lipasa de carboxilesterasa (24). En estos genes se identifica una α/β hidrolasa conservada que es común en las enzimas lipolíticas importante para el metabolismo de ácidos grasos y lípidos. El gen *lip515A* mostró una identidad del 49% (valor E $3\text{e-}80$) con una lipasa de triacilglicerol de *P. fragi* IFO-12049 (24). Para los genes de PHA, se determinó que se encuentra presente el operón *phaABC*, conteniendo la PHA sintasa (*phaC*), β -cetotilolasa (*phaA*) y acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADP (*phaB*) (24).

Es necesario recalcar que Morita denominó los microorganismos que habitan en ambientes fríos como psicrófilos, es decir, que su crecimiento óptimo es a temperaturas inferiores a 15°C (25). Sin embargo, su metabolismo se ve alterado por las bajas temperaturas, aumentando el estrés oxidativo a causa de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (25). Por medio del análisis del transcriptoma del ARN de *P. extremaustralis*, haciendo uso de la tecnología deep-sequencing, colocando la cepa en estrés con octanoato de sodio en medio LB favoreciendo así la acumulación de PHA a 8° C y 30° C (23). Se identificaron diferentes genes, entre ellos *FLG*, *flgJH*, *flgK*, *flgL*, *fleQ*, *FliF*, *FliG*, *FLIM*, *FliA* que codifican para motilidad, y fueron reprimidos a bajas temperaturas, incluso algunas chaperonas de choque térmico como *dnaJ* y *dnaK* fueron reprimidos a 8°C (25). Pero el gen principal *cspA*, que codifica para las proteínas de choque frío, aumentó su transcripción a 8°C permitiendo así la bacteria adaptarse a las condiciones de baja temperatura (23).

Una de las condiciones para que los microorganismos tengan la capacidad de biodegradar un contaminante es que se encuentre disponible (26). El diésel es un compuesto alifático que, por la falta de grupos funcionales y baja solubilidad en agua, no permite que sea utilizado por el microorganismo (26). Sin embargo, la adaptabilidad de algunos microorganismos como *P. extremaustralis* después de realizar la secuenciación de ARN en cultivos aeróbicos y microaerófilos, sobre expresó el gen *alkB* en microaerobiosis, sin estar expuesto a un hidrocarburo (26). También se determinó que este microorganismo solo utiliza

el diésel, al expresar el gen *alkB* en microaerobiosis (26). Teniendo en cuenta lo anterior, los microorganismos que permitan adaptarse son de interés para la industria biotecnológica puesto que se pueden utilizar en diferentes procesos de biorremediación (26).

Colonnella et al., identificaron en *P. extremaustralis*, gracias a su resistencia al estrés ambiental dado por los operones *Cus* y *Cop*, la presencia de porinas ubicadas en una sola región del genoma (27). Se observa de este microorganismo tiene la capacidad de degradar el hidrocarburo en presencia de CuSO_4 y añadiendo glucosa 0.05% en medio LB (27).

Huang et al. (28) identifican diferentes microorganismos capaces de degradar pesticidas, donde se menciona al género *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.* Estos microorganismos tienen la capacidad de adaptarse e inducir mutaciones que permiten degradar el pesticida, es por ello que se menciona que el género *Pseudomonas sp.* degrada aldrin ($\text{C}_{12} \text{H}_8 \text{Cl}_6$ / (1R,2R,3R,6S,7S,8S) -1,8,9,10,11,11-hexaclorotetraciclo [6.2.1.1 3,6 .0 2,7] dodeca-4, 9-dieno), clorpirifos ($\text{C}_9 \text{H}_{11} \text{Cl}_3 \text{N O}_3 \text{P S}$ / dietoxi-sulfanilideno- (3,5,6-tricloropiridin-2-il) oxi- λ^5 -fosfano), coumaphos ($\text{C}_{14} \text{H}_{16} \text{Cl O}_5 \text{P S}$ / 3-cloro-7-dietoxifosfinotioiloxi-4-metilcromen-2-ona), o,o-DDT ($\text{C}_{14} \text{H}_9 \text{Cl}_5$ / 1-cloro-2- [2,2,2-tricloro-1- (2-clorofenil) etil] benceno), diazinon ($\text{C}_{12} \text{H}_{21} \text{N}_2 \text{O}_3 \text{P S}$ / dietoxi- (6-metil-2-propan-2-ilpirimidin-4-il) oxi-sulfanilideno- λ^5 -fosfano), endosulfan ($\text{C}_9\text{H}_6\text{Cl}_6\text{O}_3\text{S}$ / 1,9,10,11,12,12-hexacloro-4,6-dioxa-5 λ^4 - tiatriciclo [7.2.1.0^{2,8}] dodec-10-eno 5 óxidos), endrin ($\text{C}_{12} \text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}$ / 3,4,5,6,13,13-hexacloro-10-oxapentaciclo [6.3.1.1 ^{3,6} .0 ^{2,7}.0^{9,11}] tridec-4-eno), hexaclorociclohexano ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Cl}_6$ /1,1,2,3,3,4 hexaclorociclohexano), metil paratión ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_5\text{PS}$ / dimetoxi- (4-nitrofenoxi) -sulfanilideno- λ^5 -fosfano), monocrotofos ($\text{C}_7 \text{H}_{14} \text{NO}_5 \text{P}$ / Dimetil [(E) -4- (metilamino) -4-oxobut-2-en-2-il] fosfato), paratión ($\text{C}_{10} \text{H}_{14} \text{NO}_5 \text{PS}$ / dietoxi- (4-nitrofenoxi) -sulfanilideno- λ^5 -fosfano). El género *Bacillus sp.* tiene la capacidad de degradar Clorpirifos, coumafos, DDT, diazinón, dieldrina, endosulfán, endrina, glifosato ($\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ / Ácido 2- (fosfonometilamino) acético), metil paratión, monocrotofos, paratión, e hidrocarburos policíclicos (28). El mecanismo por el cual los microorganismos tienen la capacidad de degradar el pesticida es enzimático, donde el compuesto se degrada o se transforma en moléculas más pequeñas no tóxicas o menos tóxicas (28). Los pesticidas se degradan por medio de expresión de genes plasmídicos y genes del cromosoma de la bacteria (28). La cepa ADP de *Pseudomonas sp.* tomó la atrazina como única fuente de C utilizando tres enzimas (28). Primero se cataliza la reacción de la decloración por hidrólisis gracias a la enzima AtzA, luego la enzima fue AtzB, que cataliza la deshidrocloración de la hidroxiatrazina para producir N-isopropil cianúrica amida, y por último la enzima AtzC, que

cataliza el ácido cianúrico y la isopropilamina formados por la N-isopropil cianúrica amida, mineralizando el pesticida a CO₂ y NH₃ (28).

En los suelos de Kirguistán, se realizó un estudio para determinar qué microorganismos ayudan en biorremediación de suelos que fueron contaminados por compuestos como el Aldrin (29). Bacterias del género *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.*, que presentaron los genes del citocromo P450 participaron en el proceso de degradación del compuesto xenobióticos Aldrin encontrado en altas concentraciones en los suelos de estudio (29). De las bacterias aisladas, capaces de degradar los pesticidas, 23% pertenecían al género *Pseudomonas* y 21% al género *Bacillus sp.* (29).

El compuesto tóxico y recalcitrante 4-cloro-2-nitrofenol (4C2NP) es utilizado para la fabricación de medicamentos, pesticidas, colorantes y otros productos químicos (30). La primera evidencia de degradación microbiana de este compuesto se dio gracias a una bacteria genéticamente modificada que fue *Pseudomonas sp.* N31 que degradó el 4C2NP a través de la formación de clorocatecol y la liberación de nitrito y cloruro de iones. *B. subtilis* RKJ 700 se aisló de una muestra de suelo recolectada en un sitio contaminado con pesticidas en Punjab, India (30), la cual decoloró el 4C2NP (0,5 mM / 1.0mM / 1.5 mM / 2.0 mM) solo en presencia de una fuente de C adicional (glucosa 10mM) en medio MSM (30). La decoloración se controló midiendo la absorbancia del sobrenadante a 430 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible (30). *B. subtilis* RKJ 700 fue capaz de decolorar 4C2NP hasta una concentración de 1.5 mM a través de la transformación de 4C2NP, el cual se redujo a 4C2AP (4-cloro-2-aminofenol) que se acetiló aún más en 4C2AAP (4-cloro-2-acetaminofenol) (30). El producto acetilado 4C2AAP se transformó en 5C2MBZ (5-cloro-2-metilbenzoxazol), que se detectó como un producto final en la ruta de biotransformación de 4C2NP. La división directa del anillo de 4C2AP también se informó y catalizó por la enzima 2-aminofenol-1,6-dioxigenasa, que es un mecanismo clave cuando las bacterias utilizan un compuesto nitroaromático clorado como única fuente de C y energía, y se formó 4C2AP como un intermedio (30). *B. subtilis* RKJ 700 no utilizó 4C2NP como la única fuente de C y energía, por lo tanto la división directa a 4C2AP puede no estar involucrada en la ruta de degradación de 4C2NP para la cepa RKJ 700 (30).

Por otra parte, los microorganismos que no han sido manipulados genéticamente son más utilizados en las tecnologías de biorremediación (31). Muchos organismos que están expuestos a una sustancia tóxica, son capaces de descomponer estos compuestos en sustancias inocuas, obteniendo de ellas nutrientes y energía (31). En la industria petrolera se utilizan emulsionantes de origen químico, el cual puede causar una contaminación secundaria

y problemas tóxicos por su uso excesivo. Es por lo anterior que se ha propuesto el uso de biosurfactantes, los cuales son producidos por microorganismos teniendo las características de adherirse a las superficies celulares, o siendo secretadas extracelularmente, permitiendo así reducir la tensión superficial e interface en soluciones acuosas y las mezclas de hidrocarburos, gracias a las propiedades antipáticas (31). Estos biosurfactantes, se han utilizado en contaminantes orgánicos, derrames de petróleo, lugares contaminados por hidrocarburos y metales pesados (31). Además, las ventajas del uso de biosurfactantes están relacionadas con su fácil degradación por los microorganismos, no se ve afectada rápidamente por las condiciones ambientales como el pH, la temperatura y la fuerza iónica, incluyendo tener una baja toxicidad (31). En relación con lo anterior, se considera que *B.subtilis* es una fuente de producción de biosurfactantes debido a su ausencia de patogenicidad y alta actividad superficial, donde la producción de estos, más la relación con microorganismos indígenas mejora la biorremediación de suelos contaminados por petróleo (31).

Sakthipriyaa et al. (32) investigaron la degradación del aceite crudo utilizando microorganismos productores de biotensoactivos, puesto que este biosurfactante desarrolla la capacidad de las células microbianas a crecer sobre los sustratos, que sería el hidrocarburo hidrófobo para aumentar su biodisponibilidad, donde la bacteria *B.subtilis*, presenta características ideales como potencial microorganismo para tratamiento de derrames de aceite, estabilidad del biotensoactivo, reducción de viscosidad y alta velocidad de degradación (32). El microorganismo *B. subtilis* YB7, aislado de la India en un sitio de derrame por crudo, fue utilizado para determinar su capacidad de degradar el crudo tomando 1 ml de la alícuota con un 2% (V/V) de aceite crudo ceroso con un 99% de pureza en un medio líquido a temperatura ambiente (32). La degradación del aceite crudo y la reducción de la viscosidad se observaron en concentraciones de 80% y 60%, respectivamente, en 10 días (32).

Montagnolli et al. (33) realizaron bioensayos en caldo Bushnell Haas (BH) para analizar la biodegradación del aceite diesel y keroseno ($C_{12}H_{26}$) añadiendo biotensoactivos a una concentración de 1 g/L para mejorar el proceso de biodegradación (33). La velocidad máxima de degradación se dio a los 400 días, ya que la biorremediación implica varias etapas: adaptación, degradación, y biodegradación microbiana (33).

Xiao et al. (34) identificaron que la cepa *B. subtilis* BSF01 utiliza los insecticidas piretroides como única fuente de C, degradando en un 89.4% la beta-cipermetrina (beta-cp), en 9.2% a la cipermetrina, 86.9% para deltametrina, 86.5% a beta-ciflutrina, y 76.8% con

cihalotrina, a una concentración de 50 mg/L en 7 días (34). Beta-cp se metaboliza en primer lugar por hidrólisis de su enlace éster gracias a una carboxilesterasa para producir 3-(2,2-dicloroetenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato y α -hidroxi-3-fenoxibencenoacetonitrilo (34). El α -hidroxi-3-fenoxibencenoacetonitrilo fue inestable y se transformó espontáneamente para producir 3-fenoxibenzaldehído (34).

Safdari et al. (35) confirmaron que *P. aeruginosa* y *B. subtilis* son competentes para la eliminación de hidrocarburos de petróleo, las cuales fueron aisladas de una refinería industrial en Irán, siendo identificadas por pruebas bioquímicas y secuenciación del gen 16S ARNr (35). Se realizan los bioensayos en 50 ml de MSM y 2,3,4 y 5% de diesel como única fuente de C. Se evidencia que la degradación disminuye cuando se aumenta de un 2 a 5 % la concentración del contaminante diésel, además de mostrar mayor eficacia de biodegradación a los 20 días (35). La cepa aislada del suelo identificada como *P. aeruginosa* mostro un 62% de capacidad para biodegradar el diesel y *B. subtilis* un 61%. Se ha identificado que existe un consorcio bacteriano en los lugares contaminados por hidrocarburos, pero factores ambientales como nutrientes y biodisponibilidad limitan la degradación; es por ello que se ha utilizado la fertilización como método para ajustar la relación C:N:O llevando una eliminación de hidrocarburos en ambientes contaminados (35). Según la estructura del contaminante los microorganismos tendrán la facilidad de utilizarlo como fuente de C y energía, es por ello, que se les facilita metabolizar alcanos y no hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y cicloalcanos (35). La biorremediación de petróleo se puede llevar a cabo por diferentes métodos como atenuación natural, bioestimulación o bioaumentación (35). Para dar inicio a una biorremediación *in situ* es importante tener en cuenta los limitantes, la capacidad metabólica de la comunidad microbiana autóctona y la biodisponibilidad del contaminante (35).

Tabari et al. (36) identifican que *B. subtilis* es un potencial biorremediador de hidrocarburos, demostrando degradación de alcanos alifáticos, siendo la mejor cepa para producir biosurfactantes, y es estable a cambios de temperatura, concentración de sal y pH entre 5 a 12, después de haber realizado un muestreo en suelos contaminados con aceite en Irán (36). Para realizar el bioensayo de biorremediación se usó como fuente de C a hidrocarburos, tomando 50 ml de medio MSM y añadiendo 2% de alcanos alifáticos y un 1ml del inóculo, colocándolo en agitación por 10 días (36). En este estudio se determinó que *B. subtilis* biodegrada alcanos alifáticos, además de mostrar una reducción de la tensión superficial de 68 a 30 dinas/cm (36).

Por otro lado, para la biodegradación de estos compuestos, existen bacterias aerobias que utilizan enzimas como dioxigenasas y las deshidrogenasas (37). Se identificó que *B. subtilis* posee alta actividad de biodegradación, la cual puede tomar hidrocarburos policíclicos como única fuente de C y energía (37). El estudio se basó en tomar 10 muestras de lodo en el suroeste de Egipto, identificando por 16S ARNr a las cepas *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mojavensis* y *B. subtilis*, las cuales fueron analizadas para degradación de acenafteno, antraceno, dibenzoantraceno, benzopireno, naftaleno, fenantreno y pireno. *B. subtilis* mostró mayor actividad de catecol 1, 2 dioxigenasa en MSM complementado con antraceno biodegradando 99% y alfa-naftaleno degradando 41% a los 10 días, y a los 28 días Benzopireno, con una eficiencia del 84.66% (37). Por medio de PCR se identifica el gen *catA*, el cual codifica para catecol dioxigenasa (37).

Shi et al. 2016 (38) observan que en *B. subtilis* la proteína DnaK estaba fosforilada tanto en condiciones de crecimiento exponencial como de estrés/inanición, es por esto que en este estudio de evidencia que es debido a que DnaK se fosforila en el residuo Y601 por una proteína bacteriana tirosina quinasa PtkA, y se desfosforila por la fosfotirosina-proteína fosfatasa PtpZ, además, evidencia que esta chaperona ayuda en supervivencia a choque térmico de *B. subtilis* (38). La proteína PtkA tiene actividad celular en proteínas de unión a ADN monocatenarias reguladores de la transcripción, y algunas enzimas metabólicas; la proteína PtkA pertenece a la familia de las tirosina quinasas bacterianas (BY-quinasas), tienen una especificidad de sustrato generando nuevos pares quinasa-sustrato durante el proceso de evolución adaptativa (38).

Seydlová G. et al. 2012 (39), permiten evidenciar en su bioensayo el sistema de protección frente al estrés ambiental, después de colocar la cepa *B. subtilis* en estrés por etanol 3%, y después de exposición prolongada se evidencia expresión de las chaperonas DnaK y GroEL (39).

Reddy et al. (40) identifica que *B. thuringiensis* tiene la capacidad de degradar el pesticida quinalfos a una temperatura de 35°C y una concentración del pesticida de 200 ppm, tomándolo como única fuente de C (40).

La degradación microbiana del insecticida fipronil por *B. thuringiensis*, después de su aislamiento en campos de cultivo de caña contaminados por este xenobiotico, se determina su capacidad biodegradadora de este compuesto a diferentes concentraciones 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 y 1.50mg/kg, los cuales fueron analizados los residuos de fipronil después de 28, 35, 35, 35 y 42 días identificándose que no hubo residuos de los metabolitos secundarios (41).

Chen et al. 2015 (42), por medio de HPLC y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), se determina la degradación de cihalotrina por medio de una ruta metabólica completa para la degradación, donde el primer paso sería la hidrólisis del enlace éster, realizada por una carboxilesterasas, sin ningún producto acumulativo persistente gracias a la cepa *Bacillus thuringiensis* ZS-19 (42). Esta cepa tomó el piretroide como fuente de C-N degradando completamente a las 72 horas. Además, este microorganismo también degrada fenpropatrina, deltametrina, beta-cipermetrina, ciflutrina y bifentrina (42).

5.3 *Pseudomonas extremaustralis*

El género *Pseudomonas sp.* se caracteriza por su diversidad metabólica y el uso de pocos componentes nutricionales, puede utilizar diferentes compuestos orgánicos como única fuente de C y energía (26). *P. extremaustralis* es altamente resistente al estrés, fue aislada de la Antártida, lado oeste de la península Antártica a 64°09'S, 60°57' W. Su adaptación para la colonización y supervivencia se ven relacionados con activación de diferentes vías metabólicas teniendo en cuenta las condiciones que se encuentran en ambientes naturales: disponibilidad de oxígeno, nutrientes, concentración de sales, y temperatura (22). Es una bacteria no patógena, resistente a los cambios de temperatura y al estrés oxidativo. Su metabolismo es no fermentativo y se evidencia un pigmento fluorescente en medio King B. Sus colonias son circulares, lisas y no pigmentadas. Es capaz de acumular grandes cantidades de polihidroxi butirato (PHB) un tipo de polihidroxi alcanoatos (PHA), siendo estos un polímero de reserva de energía utilizado en casos de inanición, siendo una ventaja adaptativa (43). *P. extremaustralis* CMPUJ U515 es la cepa aislada del Parque Natural Nacional de Nevados (Nevados NNP), un bacilo Gram negativo con un tamaño de 1.0–3.0 µm × 0.5–1 µm, móvil gracias a la presencia de un solo flagelo, con crecimiento de 4° a 35°C, a pH de 7.0, no formador de esporas, catalasa y oxidasa positivos; y con actividad de fosfatasa alcalina y fosfohidrolasa. Esta cepa presenta susceptibilidad a imipenem, piperacilina, ticarcilina, meropenem, levofloxacina, ceftriaxona, cefoxitina y ceftazidima y resistencia a penicilina, colistina o polimixina y nitrofurantoína. Esta bacteria contiene 5665 genes de los cuales 5544 codifican para proteínas, clasificándose la mayoría en la categoría de aminoácidos y metabolismo (10.5%), transcripción (8.38%) y los mecanismos de transducción de señales (7.3%) (24).

5.4 *Bacillus subtilis*

Este organismo fue una de las primeras bacterias estudiadas, y fue nombrado *Vibrio subtilis* en 1835 y renombrado *B. subtilis* en 1872 (44). Es una especie ubicua, siendo un bacilo Gram positivo móvil, con crecimiento hasta los 70°C, de 0,5 a 2,5 µm x 1,2-10 µm, produce endosporas termoestables a factores físicos como desecación, radiación y desinfectantes químicos, produce enzimas hidrolíticas extracelulares que descomponen polisacáridos, permitiendo que este microorganismo emplee estos productos como fuente de C y energía. Además produce antibióticos como bacitracina, polimixina, gramicidina y circulina siendo inhibidores de hongos y bacterias donde probablemente promueva el crecimiento vegetal (45) (46). Se demostró que *B. subtilis* no es un aerobio obligado ya que puede crecer anaerobiamente usando el nitrato en lugar del oxígeno como aceptor de electrones, gracias los genes que codifican una nitrato reductasa (45).

5.5 *Bacillus thuringiensis*

En 1902 se identifica por primera vez que *B. thuringiensis* es un biocontrolador de *Bombyx mori* el cual estaba causando daños en la industria de la seda en Japón, donde posiblemente utiliza alguno de los mecanismos de acción teóricos, siendo el primero la formación de poros en la membrana celular causando así el desequilibrio osmótico y el segundo sería la activación de muerte celular dado la apertura de canales iónicos (47). Es un bacilo Gram positivo, móvil, con un tamaño entre 1 a 1.2 µm de ancho y 3 a 5 µm de largo, esporulador (48) siendo una de las características de *B. thuringiensis* puesto que generan una espora subapical al igual que uno o varios cuerpos parasporales compuestos de proteínas Cry o Cyt, los cuales tienen una actividad insecticida específica (49).

Mizuki et al., informan sobre una nueva categoría de proteínas de 90 kDa nombradas parasporinas las cuales no causan daño citopático a los invertebrados, pero muestra efecto tóxico a células alteradas por algún tipo de cáncer (7).

5.6 Proteínas hipotéticas

Las proteínas son biomoléculas formadas por C, H, O y N. Los genomas de los organismos codifican una secuencia de aminoácidos específica dando lugar a proteínas

sintetizadas en los ribosomas, que luego desempeñan funciones estructurales, enzimáticas, de transporte, movimiento, regulación y señalización (50).

Determinar la función de una proteína permite tener mejor comprensión de los mecanismos de adaptación microbiana, pero todavía existe un número considerable de secuencias que no se pueden predecir puesto que entre el 30 y 40% de los genes no tienen una función conocida a nivel biológico y fisiológico (51) (52), a estas moléculas se les conoce como proteínas hipotéticas (53) (54) (10). Las proteínas hipotéticas son una fracción de genes en genomas secuenciados que se encuentran codificados en varios linajes filogenéticos pero no ha sido caracterizado experimentalmente, ni en su funcionamiento o términos químicos (55).

Los dominios de función desconocida (DUF) son aquel grupo de proteínas que presentan un dominio funcional o estructural, pero no se ha demostrado experimentalmente en términos químicos, o que se pueda vincular a un gen (55). Se puede asignar su posible función basándose en homología de la correlación con proteínas conocidas, ya que muchas se encuentran en más de una especie bacteriana, con probabilidad de que si se traduce tenga una función y no que sea producto de un pseudogen (10).

Las proteínas huérfanas (ORF), o proteínas huérfanas mal conservadas, están conformadas por al menos 50 residuos de aminoácidos, con baja probabilidad de que se expresen ya que son enzimas que no tienen una proteína o secuencia de genes que coincidan (55) (14).

5.7 Xenobióticos en la agricultura.

La demanda agrícola y el cambio climático generan presión para el uso de fertilizantes químicos y pesticidas, permitiendo así satisfacer la demanda alimentaria (56). El uso indiscriminado de pesticidas causa problemas ambientales como contaminación del suelo, agua, aire, pérdida de fertilidad, acidificación, lixiviación de nitrato en suelo e invasión de malezas, además de problemas en salud pública como incidencia de enfermedades renales, autoinmunes, esterilidad, cáncer, trastornos endocrinos y neurológicos (56) (57). Es importante aclarar, que los pesticidas son el grupo de productos químicos que controlan organismos indeseables en la producción, se aplican para mejorar el rendimiento y calidad del cultivo (58). Estos productos pueden ser inorgánicos y orgánicos como herbicidas, insecticidas, nematicidas, y fungicidas (58).

El uso de pesticidas aumenta en países en vía de desarrollo, ya que son económicos y de fácil acceso, siendo India, Ecuador, Colombia, Ucrania, Turquía, Bolivia, Perú, Reino Unido, Alemania y Chile los países con mayor número de tierras agrícolas en el mundo. Colombia cuenta con una superficie de 1.109.500 km², de las cuales 425.030 km² están destinadas a uso agrícola, el país tuvo una tasa de consumo de pesticidas de 48,618.47 ton/año, de las cuales, 17.595.15 ton/año fueron herbicidas (59). Para el año 2013, la tasa de consumo en Colombia del herbicida glifosato fue de 9.605 ton, el cual es utilizado para inhibir la enzima 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintasa de las plantas, cuyo objetivo es impedir la síntesis de fenilalanina, triptófano y tirosina, al igual que del ácido benzoico, matando así la planta (8).

5.7.1 Características generales del glifosato

El glifosato (N-fosfometilglicina) es un herbicida cosmopolita de amplio espectro usado para control de arvenses. Es un ácido orgánico polar débil, soluble en agua, conformado por una fracción del aminoácido glicina y un radical aminofosfato unido como sustituyente de uno de los hidrógenos del grupo amino (Figura 1). Es un potente quelante que une fácilmente cationes divalentes (por ejemplo, Ca, Mg, Mn, Fe) y forma complejos estables (60).

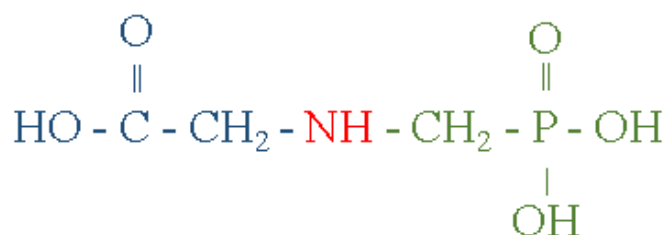


Figura 1. Estructura del glifosato. Se observa de color azul la fracción del aminoácido glicina, de verde el radical aminofosfato unidos por un ácido orgánico débil de color rojo. (61).

5.7.1.1 Propiedades fisicoquímicas del glifosato

En la Tabla 1 se describen las propiedades fisicoquímicas del glifosato:

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del glifosato (61) (60).

Propiedad	Compuesto Puro (Ingrediente activo)	Sal de Glifosato-Isopropilamonio
Fórmula Molecular	C ₃ H ₈ N O ₅ P	C ₆ H ₁₇ N ₂ O ₅ P

Peso Molecular	169.1 g/mol	228.2 g/mol
Estado Físico	Sólido blanco	Líquido viscoso de color ámbar a amarillo
Olor	Inodoro	Prácticamente inodoro, ligero olor a amina
Densidad	0.5 g/mL	1.160 - 1.180 g/mL
Punto de Fusión	184.5 ° C	No Aplicable (Estado líquido)
Presión de Vapor	1.84 x 10 ⁻⁷ mm de Hg a 45°C	3 x 10 ⁻⁷ mm Hg a 25°C
Punto de Ebullición	Se descompone	Se descompone
pH en solución al 1%	2.5	4.7
Solubilidad en Agua	12 .000 ppm a 25°C	900. 000 ppm a 25°C
Otros Solventes	Ninguno	Sólo soluble en agua
Estabilidad	32 días a 25°C y pH = 5,7 ó 9	32 días a 25°C y pH = 7 ó 9
Coefficiente de Partición octanol/agua	POW = -2.8	
Constante de Ley de Henry	< 7 x 10 ⁻¹¹	

En su forma pura, el glifosato se observa que es un sólido cristalino, de color blanco e inodoro (61). Cuando el glifosato es aplicado en el suelo puede llevarse a cabo su mineralización, inmovilización o lixiviación, pero no se volatiliza ya que su presión de vapor es baja (61). Para que ocurra la mineralización del glifosato, las propiedades del suelo deben incluir un pH alto y fósforo bajo, ya que esta mineralización es realizada principalmente por microorganismos (61).

Después de que el glifosato se encuentre en suelo, puede movilizarse a los cuerpos de agua por medio del lavado de maquinaria agrícola o enjuague de bidones, generando un impacto en especies acuáticas como algas y plantas acuáticas sensibles a este herbicida (62) a diferencia de las cianobacterias que son más resistentes debido al efecto de eutrofización que produce el aporte de fósforo (62) (63).

5.7.1.2 Mecanismos de acción

El herbicida glifosato, es transportado por el floema a los tejidos meristemáticos como los ápices de los brotes y las puntas de las raíces, desde las partes aéreas de las plantas (64). El mecanismo de acción del glifosato se da gracias a la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) la cual se encuentra en bacterias, hongos y

plantas (65). Esta enzima, cataliza la reacción de la formación de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato a partir de shikimato-3-fosfato y fosfoenol piruvato, dando así el paso a la síntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptófano y tirosina (65) (66). El glifosato también es un quelante de minerales, el cual se une a ellos generando la disminución de estos minerales, los cuales son cofactores esenciales en algunos procesos biológicos en las plantas y los organismos que se alimentan de estas (67).

5.8 Biorremediación por *Pseudomonas extremaustralis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*

La biorremediación microbiana por hongos, bacterias, actinomicetos y virus son una solución a la problemática de contaminación por pesticidas en los campos agrícolas, eliminando del suelo los organoclorados, organofosforados y carbamatos gracias a su actividad enzimática (28). Los microorganismos del suelo, que se encuentran en contacto con un compuesto xenobiótico, desarrollan un sistema genéticamente determinado para adaptarse a las condiciones de estrés, llevando a cabo biotransformación, biomineralización, bioacumulación, o biodegradación del pesticida (28). La degradación de compuestos xenobióticos, es llevada a cabo por los microorganismos gracias al uso de enzimas catalizadoras que generan reacciones bioquímicas las cuales están involucradas en alguna vía para degradación del contaminante. Las enzimas con la capacidad degradadora se pueden agrupar en diferentes tipos, como se muestra en la Tabla 2. Diferentes cepas bacterianas se han caracterizado por tener la capacidad de tener el armamento enzimático para degradar compuestos xenobióticos, como lo son *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Ralstonia sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Nocardiopsis sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Acetobacter sp.* y *Alcaligenes sp.* (59)

Tabla 2. Enzimas que participan en la biorremediación y sus funciones (68).

Enzima	Ejemplo	Función
Oxidorreductasas	Oxigenasas	Catalizar la oxidación de compuestos aromáticos como por ejemplo los policlorobifenilos incorporando uno a dos moléculas de O llevando así a la transformación y mineralización del compuesto.
	Lacasas	En compuestos aromáticos realiza el corte del anillo, reduciendo así una molécula de O en agua y produce radicales libres.
	Peroxidasas	Cataliza la reacción de reducción en presencia de peróxidos, como el peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) y generar radicales libres reactivos después de la oxidación de compuestos orgánicos.

Hidrolasas	Lipasas	Tiene la capacidad de romper los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos. Es utilizada en tratamientos de aguas residuales, degradación de hidrocarburos poliaromáticos, etc.
	Celulasas	Descompone los compuestos celulolíticos en azúcares simples. Son usadas estas enzimas en tratamientos de residuos orgánicos, como los residuos de algodón aserrín y arroz.
	Carboxilesterasas	Cataliza la hidrólisis del enlace éster carboxílico presente en pesticidas sintéticos como los organofosforados con adición de agua.
	Fosfotriesterasas	Cataliza la hidrólisis del fosfodiéster, componente de los organofosforados.
	Deshalogenasas	Utilizado para la biodegradación de compuestos alifáticos halogenados como el 1,2,3-tricloropropano.

Se ha identificado que *P. extremaustralis* genera PHAs como mecanismo de almacenamiento de C cuando se encuentra expuesta a ciertas condiciones de deficiencia de P, N u O, y al tiempo un exceso de fuentes de C (24). Se identifica el operón *phaABC*, conteniendo la PHA sintasa (*phaC*), la β -cetotiolasa (*phaA*) y la acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADP que permiten generar los biopolímeros (24). Además de tener el gen *AlkB* que codifica una oxigenasa la cual le permite degradar el diesel tomándolo como fuente de C.

Se observa que *B. subtilis* tienen un armamento enzimático con la capacidad de degradar xenobióticos, como es el caso de 4-cloro-2-nitrofenil (4C2NP), siendo un compuesto altamente tóxico y recalcitrante, que se utiliza para la fabricación de colorantes, pesticidas, medicamentos y productos químicos (30). Este bacilo degrada 4C2NP gracias a la oxidación catalizada por una oxigenasa, liberando el ion nitrito (30). También, se ha identificado que puede degradar los compuestos sin producir ningún producto tóxico, como fue en el caso de la degradación de la cipermetrina asociada a los genes codificantes de enzimas esterasa (700 pb) y lacasa (1200 pb) identificadas por PCR (69).

La bacteria *B. thuringiensis* también demostró tener la capacidad degradadora de compuestos complejos como quinalfos y fipronil, siendo estos un insecticida (40) (41). El bacilo los tomó como única fuente C (40) (41).

5.9 Proteínas de shock térmico

El plegamiento de polipéptidos es llevado a cabo gracias a la asistencia de un conjunto de proteínas llamadas chaperonas moleculares, siendo necesarias para la viabilidad celular tanto en condiciones normales y de estrés, pues ayudan a la homeostasis proteica intracelular (16). Las chaperonas se dividen en tres grupos, donde el grupo I se conservan en bacterias y mitocondrias, el grupo II se localizan en el citosol de eucariotas y citoplasma de arqueas; y el grupo III se caracteriza por encontrarse tanto en bacterias como en arqueas (70).

En *Escherichia coli* existen cuatro sistemas principales de chaperonas en el citoplasma. El primero, es el factor desencadenante asociado al ribosoma, el cual ayuda al plegamiento proteico de la cadena nascente. El segundo, es el sistema Hsp70 que consiste en DnaK (Hsp 70), su cofactor DnaJ (Hsp40) y el factor de intercambio de nucleótidos GrpE, siendo el sistema de reconocimiento de la cadena de polipéptidos extendida. El tercero, es el sistema Hsp60, que consiste en GroEL (Hsp60) y su cofactor GroES (Hsp 10), que ayuda al plegamiento de que exponen superficies hidrófobas. El cuarto, son las ATPasas Clp pertenecientes a la familia Hsp100, ayudando a desplegar proteínas y disgregar a los agregados de proteínas preformadas (71).

Algunas especies de bacterias expresan genes de chaperonina Hsp60, como en *Agrobacterium*, en Firmicutes y en α -proteobacteria, siendo estas chaperoninas homólogos de GroEL/ES, que pueden llevar a cabo actividades complementarias al plegamiento proteico y control de calidad, como es el caso de resistencia a la exposición letal del choque térmico (72).

La chaperonina GroEl es la mejor estudiada según su mecanismo en *E. coli*, donde sus subunidades de 60 kDa se encuentran constituidas por dos anillos metaméricos (15). Cada subunidad contiene tres dominios funcionales, el dominio ecuatorial, sitio del bolsillo de unión a ATP; el dominio apical que une a sustrato y a GroES, el dominio intermedio que conecta los dos anteriores y permite cambios estructurales dinámicos dentro de la molécula (15). Los cilindros tetradecaméricos albergan los sitios de unión para las proteínas de sustrato desplegadas/mal plegadas que residen dentro de la luz del barril (15). En ausencia de cofactores necesarios algunas proteínas del sustrato pueden unirse fuertemente a la molécula GroEL durante períodos prolongados de tiempo en una conformación desplegada (15).

6 METODOLOGÍA

6.1 Tipo de investigación

El presente trabajo se llevará a cabo de un tipo de investigación mixta, ya que tendrán en cuenta enfoques explicativo, descriptivo, exploratorio y el experimental.

6.2 Universo, población y muestra

Universo

El universo de estudio son las proteínas.

Población

La población seleccionada para el estudio corresponde a las proteínas relacionadas con estrés de *P. extremaustralis*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis kurstaki*.

Muestra

Proteínas relacionadas con estrés de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1.

6.3. Variables

Variables independientes

Para lograr determinar las proteínas relacionadas a estrés, las variables independientes involucradas son el glifosato y los antibióticos ampicilina y tetraciclina utilizadas en las bacterias *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 como agentes inductores de estrés.

Variables dependientes

Para la investigación a desarrollar se presume de la presencia de las variables dependientes como lo son las proteínas relacionadas a estrés de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD -1.

6.4. Hipótesis

Hipótesis nula

En *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, no se asocian proteínas que estén relacionadas con estrés.

Hipótesis alterna

En *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, existen proteínas relacionadas con estrés.

6.5. Indicadores

Número de proteínas hipotéticas, proteínas principales involucradas en las vías de AMPA y C-P liasa para la degradación de glifosato y proteínas de choque térmico presentes en *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1.

6.6. Técnicas y procedimientos

Cepas: La cepa *P. extremaustralis* CMPUJ U515 fue obtenida del Banco de cepas de la Pontificia Universidad Javeriana, *B. subtilis* ATCC 6633 proviene del American Type Culture Collection y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 del producto comercial Dipel (TM). Las cepas se cultivaron en medio tripticasa soya. *P. extremaustralis* fue conservada en glicerol 30% a -20°C, y *B. subtilis* y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 se conservaron en glicerol 30% a -20°C y en papel filtro estéril impregnado con esporas en frasco ámbar.

Identificación funcional de proteínas hipotéticas en relación a degradación de xenobióticos: Para los análisis se utilizó los genomas de las cepas de estudio depositados en la base de datos GenBank con número de acceso para *P. extremaustralis* de

NZ_FUYI01000001.1, *B. subtilis* ATCC 6633 de NZ_CP034943.1 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 de NZ_CP004870.1. Se seleccionaron para cada caso las proteínas con anotación “hypothetical protein”, y las respectivas secuencias se seleccionaron para realizar posteriormente la búsqueda de proteínas con similitud de secuencia y que tuvieran anotación funcional relacionada con degradación de xenobióticos, haciendo uso del programa tBLASTn del NCBI, con un valor de corte $E < 8e-17$, identidad $>40\%$ y cobertura $>83\%$. Las proteínas relacionadas con degradación de xenobióticos se tomaron según lo reportado por Huang et al. (28) (Tabla 2). Además, por medio de tBLASTn, se realiza la determinación de proteínas similares a las enzimas involucradas en la degradación del glifosato de la vía AMPA y la vía C-P liasa, según lo reportado por Zhan et al. (73), Pedotti et al. (74), y Villareal-Chiu et al. (75).

Utilización de glifosato como única fuente de C: La capacidad de las bacterias en estudio de tomar como única fuente de C al glifosato se determinó cualitativamente inoculando las cepas en medio mínimo de sales, y evaluando a los siete días de incubación la presencia de crecimiento bacteriano. Se usó glifosato comercial Roundup® 747 SG, siendo este la fuente de C para el medio mínimo de sales, como se observa en la Tabla 3:

Tabla 3. Sales del medio selectivo sólido donde el glifosato es utilizado como fuente de carbón (76).

Reactivo	Cantidad
KH_2PO_4	1.36 g/L
Na_2HPO_4	2.13 mg/L
NaCl	0.50 g/L
NH_4SO_4	0.50 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.20 g/L
CaCl_2	0.01 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001 g/L
Glifosato	6 g/L

Pruebas de sensibilidad a antibióticos: La síntesis de las posibles proteínas GroES/GroEL se realizó mediante la exposición de las cepas del estudio a los antibióticos ampicilina y tetraciclina a concentraciones desde 0.4 $\mu\text{g/mL}$ hasta 100 $\mu\text{g/mL}$. Se realizó la preparación del inóculo de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, tomando 3 -5 UFC de una placa de 24 horas, pasándolas a un tubo con 5 mL de tripticasa soya hasta llegar a la concentración del estándar 0.5 McFarland

(1.5×10^8 Células /mL). Para la preparación de los discos impregnados con el antibiótico se realizan stock de las diferentes concentraciones desde 0.4 mg/mL hasta 100 mg/mL, posterior a ello se tomaron 1 μ l de las diferentes concentraciones para impregnar los discos de papel filtro de aproximadamente 5 mm logrando concentraciones en el disco desde 0.4 μ g/mL hasta 100 μ g/mL, y se esperó a que secan antes de colocarlos en la placa. Para realizar el método cualitativo de difusión se sumerge un hisopo estéril en el inóculo 0.5 McFarland, sembrando cada cepa en agar Müller-Hinton de manera diagonal, transversal, horizontal y se pasa el hisopo por todo el borde del medio tres veces; se espera 3 a 5 minutos para colocar los discos e incubar 18 horas a 30°C. Se realiza la lectura con la medida del diámetro del halo evidenciado. Al realizar el método cuantitativo de macrodilución se toman 10 tubos con caldo Müller-Hinton más las concentraciones de 100 μ g/mL hasta 0.4 μ g/mL de antibiótico, se sumerge un hisopo estéril en el inóculo 0.5 McFarland y se siembra cada tubo, realizando la lectura de su absorbancia a 600nm a las 18 horas (77).

Extracción proteínas totales: Se realiza siembra masiva de la bacteria en agar tripticasa soya por 24 horas a 30°C, posterior a ello se recoge la biomasa y se diluye en caldo tripticasa soya, se centrifuga a 4.000 rpm por 8 minutos y se incuba a -20°C por 2 horas. Se descartó el sobrenadante y al pellet se adicionó 4 mL del buffer 1 (Tris-HCl 50 mM- pH 8.0, 25% de sacarosa, 1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y 60 μ g de lisozima/mL y se colocó a 4°C por 45 minutos, con mezclado previo sin generación de burbujas. Se agregó 0.5 volúmenes del buffer 2 (Tris- HCl 50 mM- pH 8.0, 0.4% de triton X-100) y se incubó a -20°C por 45 minutos. Para realizar la lisis celular, por medio de una jeringa estéril de calibre 25 se retira el embolo depositando la muestra en la jeringa y pasándola a un falcón estéril por goteo, repitiendo este paso por 3 veces. Por último, se almacena a -20°C en oscuridad.

Cuantificación de proteínas: Por medio de método Bradford se realiza cuantificación de proteínas, ya que la proteína se une al colorante (azul de Coomassie) formando un complejo proteína- colorante viéndose en cambio de color. Se realiza la lectura de la absorbancia a 595 nm frente al banco.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS: Se determinó la posible presencia de las proteínas de choque térmico por medio de la electroforesis de proteínas, donde se realiza un gel concentrador y separador al 10%, dejándolas correr por 4 horas, con el azul de Coomassie se colorea por 30 minutos y se decoloró con ácido acético glacial por 2 horas.

7 RESULTADOS

Los genomas de las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 están depositados en la base de datos Genome del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). El genoma de *P. extremaustralis* CMPUJU 515 tiene en total 5665 genes, y de estos 5544 eran genes codificadores de proteínas, y 1417 (25.55%) se denominan hipotéticas (24). El genoma de la cepa *B. subtilis* ATCC 6633 tiene 3941 en su recuento de proteínas (78), de estas 469 (11.9 %) se denominan hipotéticas. La cepa *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 tiene un recuento de proteínas es de 6538 (79), de las cuales 1046 (15.99%) son proteínas hipotéticas. Luego se realizó la predicción funcional de las proteínas hipotéticas haciendo uso de la herramienta tBLASTn, donde las cepas en estudio tienen 63, 1 y 6 tienen secuencias con similitud a proteínas degradadoras de xenobióticos respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Proteínas hipotéticas de las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 con posible relación con degradación de xenobióticos.

Proteína	<i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD-1
Oxigenasas	WP 085040859.1, PRD17982.1, OHC32105.1, WP 127672052.1, OHC34248.1.		
Peroxidasas	PIF48157.1, WP 105818841.1		
Oxidoreductasa	SQF99578.1, OHC35759.1, WP 027981428.1, RUQ46164.1, SQF99578.1, AXQ48582.1, WP 061291478.1, OHC30459.1, TDF12121.1, WP 133075426.1.		WP_001146295.1
Oxidoreductasa dependiente de FAD- Degradación glifosato	OHC34248.1, WP 027981428.1, RUQ46164.1, WP 133101968.1, WP 133075426.1, WP 133101968.1, OHC35759.1, WP 027981428.1, RUQ46164.1, WP 133099032.1, RUQ47007.1, WP 133074398.1, WP 133101968.1, WP 133075426.1, WP		

	027981428.1, WP 133099032.1, OHC32576.1		
Lipasas	OHC34561.1		
Esterasas	SQF99559.1, KSW26486.1, P 038713356.1, OHC34865.1, OHC34558.1,OHC 30601.1		
Carboxilesterasas	AQX48504.1		WP_000798320.1, WP_013658800.1
Hidrolasas	OHC35694.1, WP 027981444.1 ,OHC9589.1, OHC32430.1,PIF52651.1, WP 053937255.1, SAJ33699.1,OHC33724.1, WP 041702820.1, OHC32219.1, OHC33855.1,OHC36281.1, MAD27263.1, WP 035550064.1,TDF25511.1, WP 133076562.1, WP 133100025.1 ,VAV70700.1,OHC35557.1		WP_074628820.1, WP_000577705.1, WP_034328134.1, WP_002101148.1
Deshidrogenasa	PIF48713.1, AXQ50573.1	WP_003223613.1	

Las cepas de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 se evaluaron en su capacidad de usar el glifosato como única fuente de C. Ninguna de las cepas de estudio creció en presencia de glifosato (Figura 2).

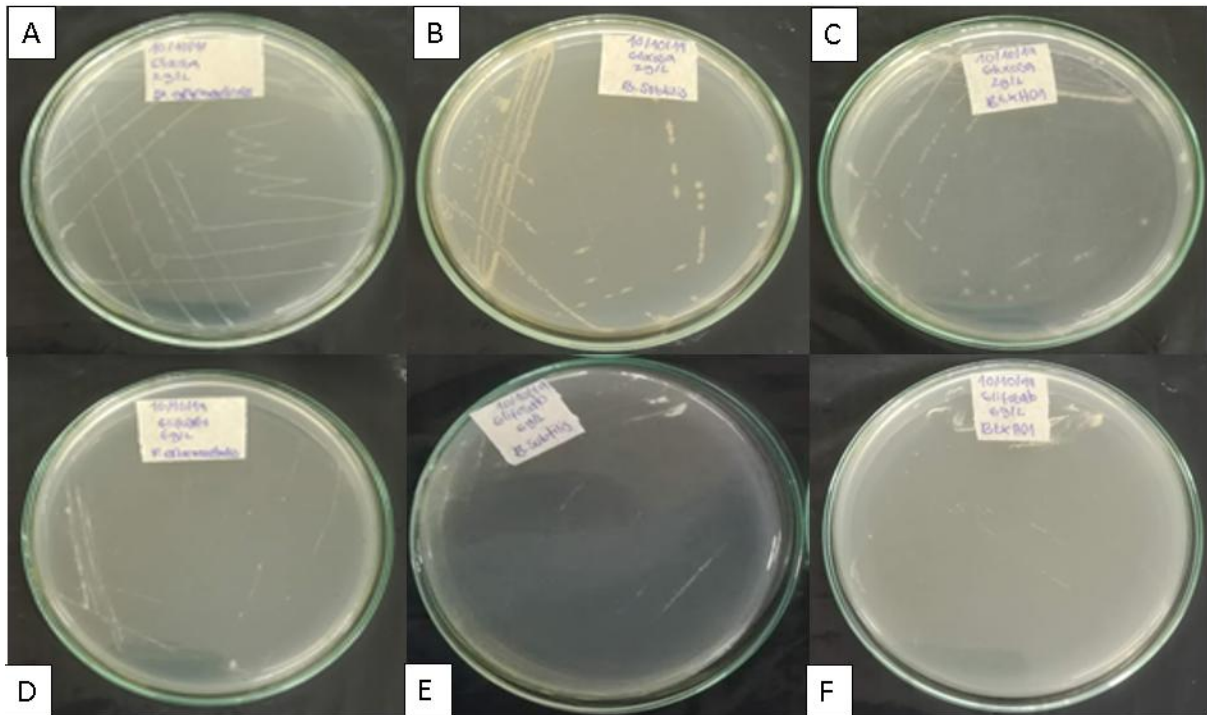


Figura 2. Crecimiento de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 en medio mínimo mineral. Se observa crecimiento de *P. extremaustralis* CMPUJ U515 (A), *B. subtilis* ATCC 6633 (B) y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 (C) en medio mínimo mineral con glucosa como única fuente de C (control); no se observa crecimiento de *P. extremaustralis* CMPUJ U515 (D), *B. subtilis* ATCC 6633 (E) y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 (F) en medio mínimo mineral adicionado con glifosato como única fuente de C.

Se realizó análisis funcional con la herramienta BLAST del NCBI, usando secuencias de aminoácidos de enzimas asociadas a la degradación de glifosato por la vía AMPA y la vía C-P liasa (73) (74) (75) (Tabla 5). Se encontró que las cepas contienen genes codificantes para enzimas de la vía AMPA, en tanto no se determinaron buenos resultados con respecto a la vía C-P liasa.

Tabla 5. Identificación de enzimas involucradas en las vías de degradación del glifosato presentes en el genoma de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1.

Glifosato oxidorreductasa (GU214711.1)			
	Cobertura	Valor E	Identidad
<i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515	96%	2 e-82	37.47%
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	93%	4 e-04	22.30%
<i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD-1	93%	6 e-09	22.41%
Glicina oxidasa (EC 1.4.3.19)			

	Cobertura	Valor E	Identidad
<i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515	85%	2 e-13	26.40%
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	83%	1 e-18	29.43%
<i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD-1	95%	2 e-07	22.76%
C-P Liasa (NP_ 418522.1)			
	Cobertura	Valor E	Identidad
<i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515	18%	1	33.33%
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	11%	11	32.26%
<i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD-1	9%	5	40.74%

Se analizó la susceptibilidad a antibióticos. Se inició con el método de difusión en disco (Figura 3), usando concentraciones desde 0.4 µg/mL hasta 100 µg/mL con ampicilina y tetraciclina (77). *P. extremaustralis* CMPUJ y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 resultaron sensibles a ampicilina. *B. subtilis* ATCC 6633 presentó resistencia a ampicilina, por ello se usó tetraciclina para inducción de estrés.

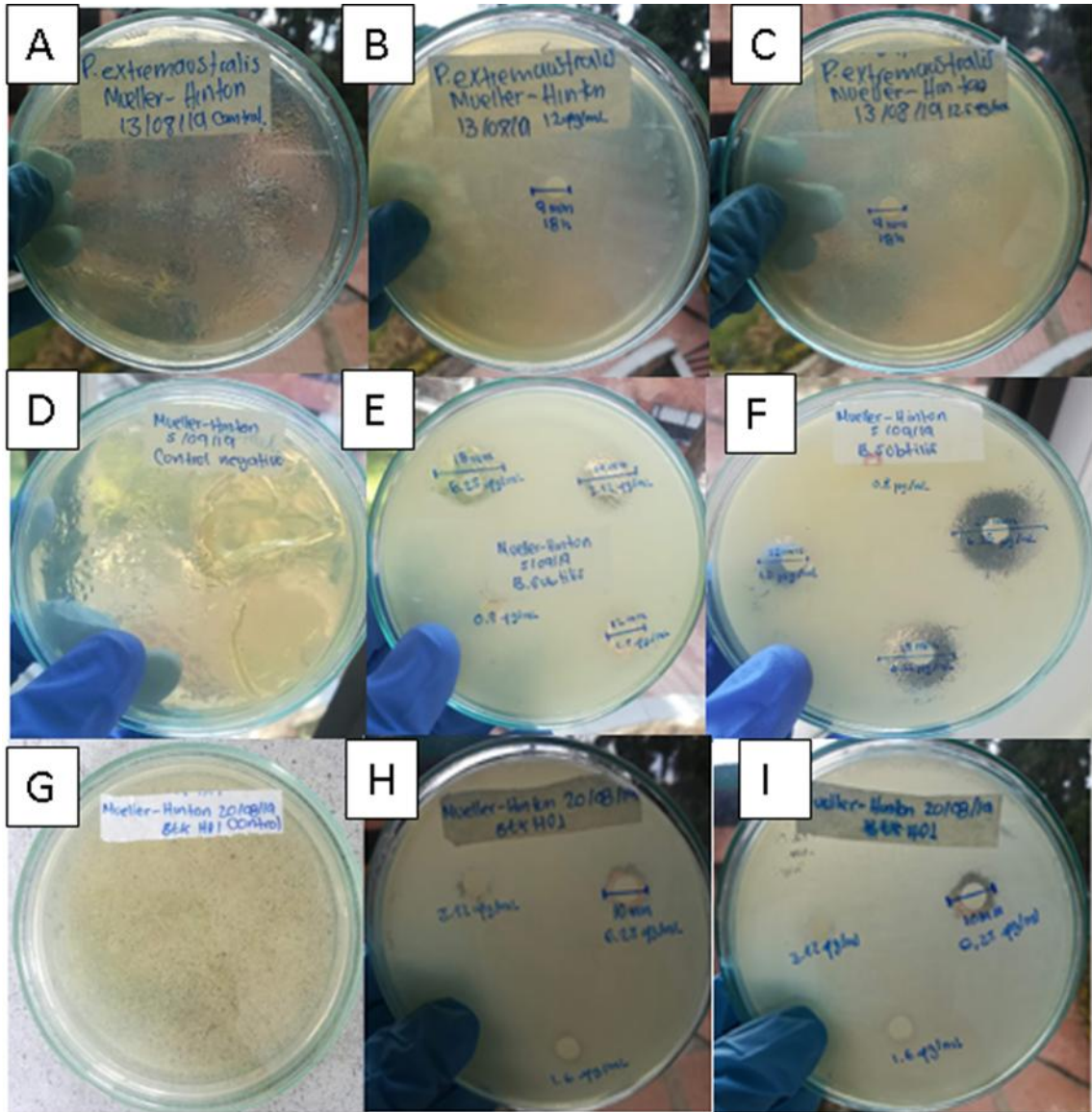


Figura 3. Método de difusión disco-placa realizado a las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1. Los controles negativos (cajas sin inocular) se pueden observar en A, D, y G. En B y C se observa sensibilidad (9mm) para *P. extremaustralis* CMPUJ U515 a una concentración de 12.5 µg/mL de ampicilina. Para E y F se observa sensibilidad (12mm) en *B. subtilis* ATCC 6633 evaluado con tetraciclina a una concentración de 1.5 µg/ mL. En H y I se observa sensibilidad (10 mm) para *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 a una concentración de 6.2 µg/mL con ampicilina.

En la prueba de macrodilución en caldo aplicado a *P. extremaustralis* CMPUJ U515, se identificó que la CMI es de 6.2 µg/mL con ampicilina, de *B. subtilis* ATCC 6633 CMI es de 0.8 µg/mL con tetraciclina y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 es 3.1 µg/mL con ampicilina (Figura 4).

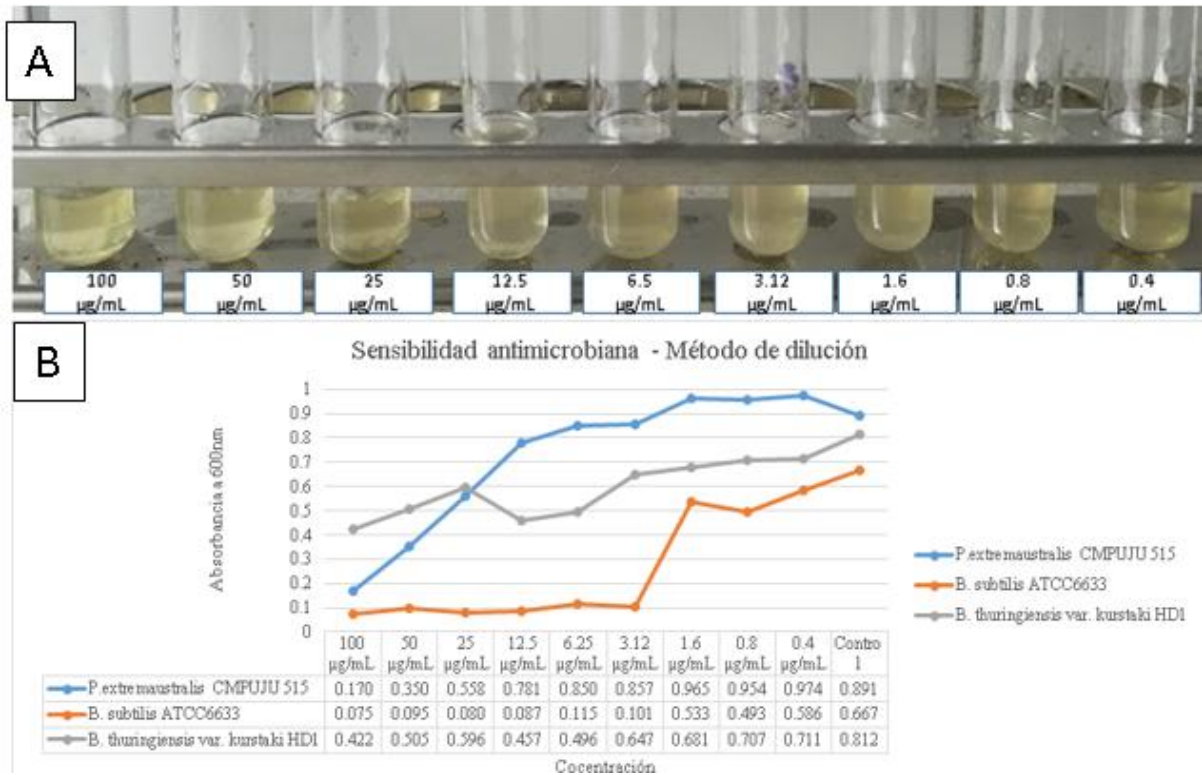


Figura 4. Método de sensibilidad antimicrobiana - Método de macrodilución en caldo realizado a las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1. A. Se observa el grado de turbidez para *P. extremaustralis* CMPUJ U515 a diferentes concentraciones de antibiótico. B. Se observa inhibición del crecimiento de los microorganismos en estudio al ir aumentando la concentración de los antibióticos utilizados.

Las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 se colocan en crecimiento en agar Tripticasa Soya más el antibiótico, el cual permite el estrés necesario sin eliminar el microorganismo (Figura 5). Se observa el crecimiento de *P. extremaustralis* CMPUJ U515 en estrés a una concentración de 10 µg/ mL de ampicilina, *B. subtilis* ATCC6633 a una concentración de 1 µg/mL de tetraciclina y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 con 1 µg/ mL de ampicilina.

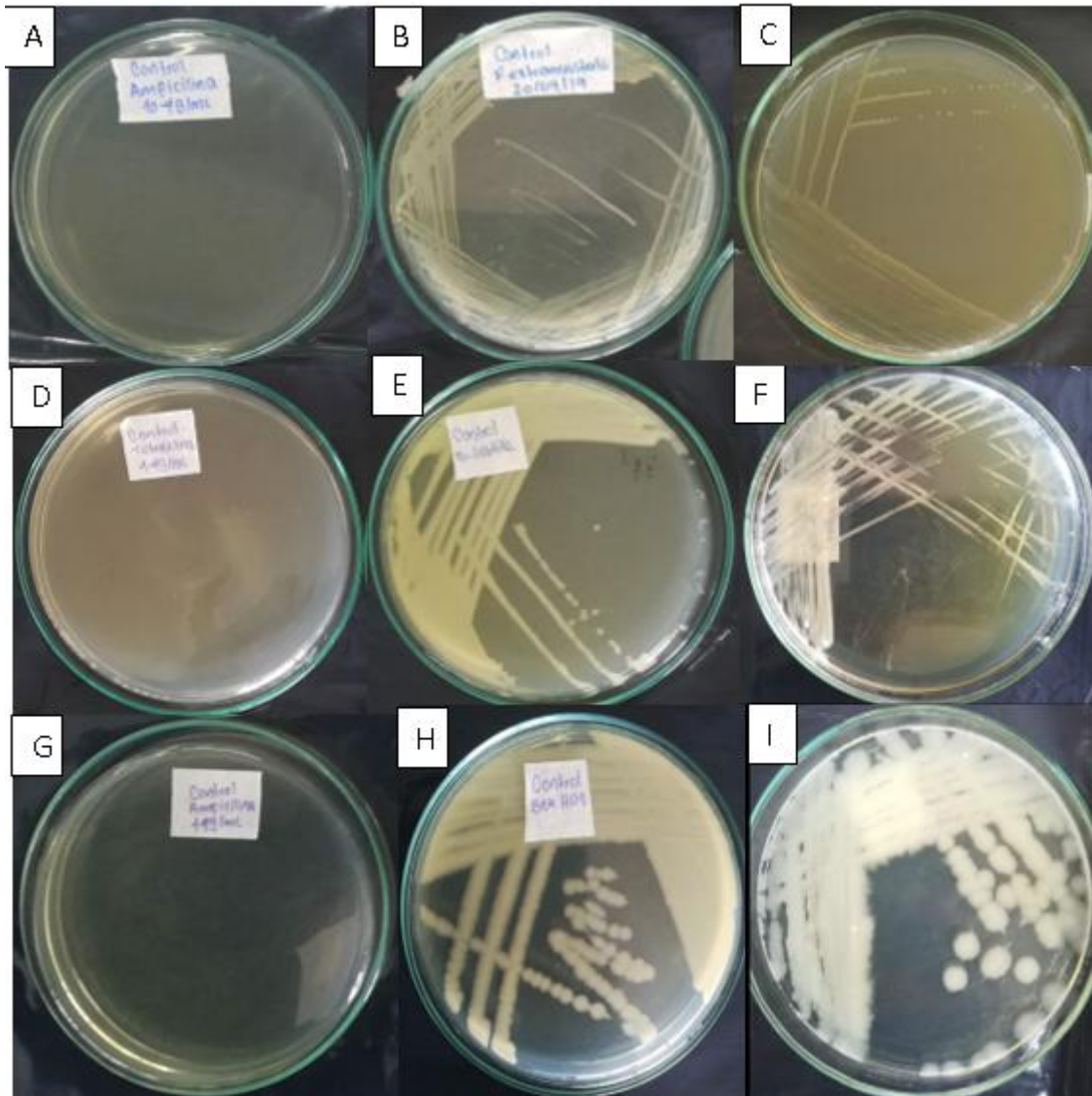


Figura 5. Crecimiento de *P. extrem australis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 en agar Trypticase Soya más el antibiótico. Se observa el control negativo con ampicilina 10 µg/mL sin inóculo (A), control positivo de *P. extrem australis* CMPUJU 515 en tripticasa soya (B) y el crecimiento de *P. extrem australis* CMPUJ U515 con ampicilina 10 µg/mL (C). Para *B. subtilis* ATCC 6633 se observa el control negativo con tetraciclina 1 µg/mL sin inóculo (D), el control positivo de *B. subtilis* ATCC 6633 en agar tripticasa soya (E) y el crecimiento de *B. subtilis* ATCC 6633 con tetraciclina 1 µg/mL (F). Finalmente, se observa el control negativo con ampicilina 1 µg/mL sin inóculo (G), control positivo de *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 en agar tripticasa soya (H) y el crecimiento por agotamiento *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 con ampicilina 1 µg/mL (I).

Posteriormente se realizó extracción de proteínas totales de las cepas que se cuantificaron por medio del método Bradford, realizando la lectura a 595 nm como se identifica en la Tabla 6 y Figura 6.

Tabla 6. Concentraciones patrones de Albumina.

Concentración (µg/ml)	Absorbancia
0	0
11.36	0.188
22.7	0.413
37.5	0.563
45.45	0.707

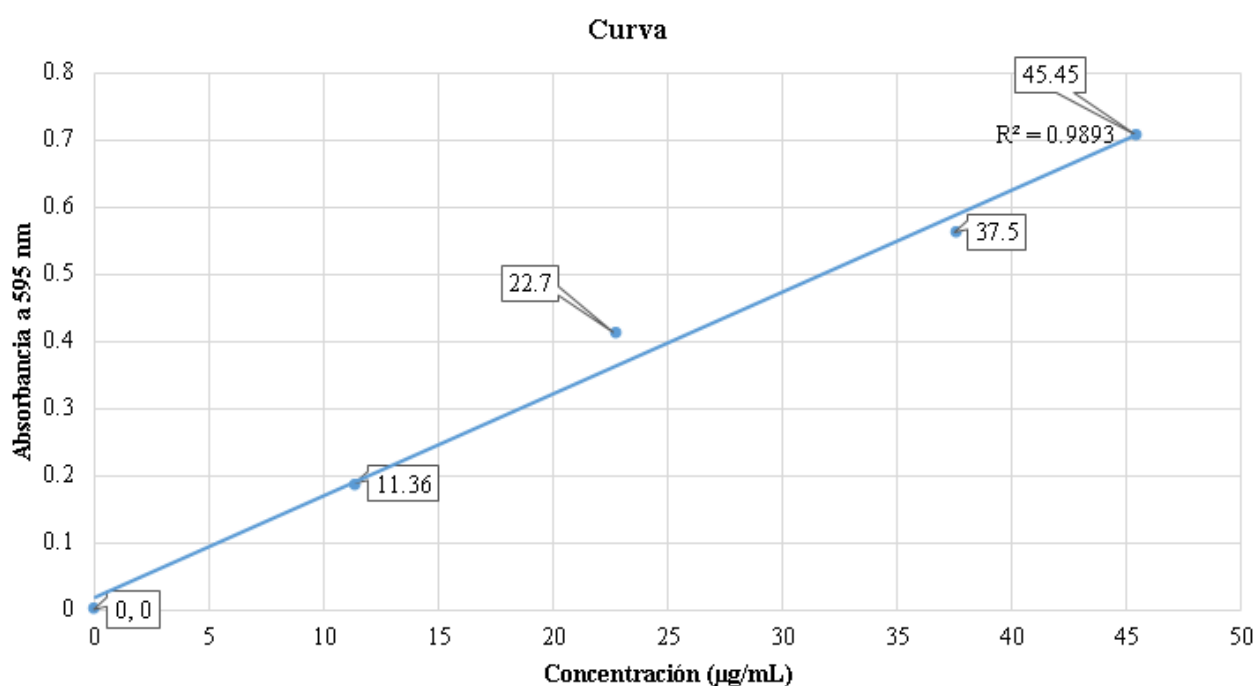


Figura 6. Cuantificación de proteínas.

En la Tabla 7 se indican las concentraciones de proteínas totales de cada bacteria, antes y después de ser estresada con el antibiótico. Se observa que hay una mayor síntesis de proteínas en respuesta al estrés por ampicilina para *P. extremaustralis* CMPUJ U515 y *B. thuringiensis* HD-1, en tanto que tetraciclina no causó ese efecto en *B. subtilis* ATCC 6633.

Tabla 7. Concentraciones de proteínas totales de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis* HD-1.

Muestra	Antes del estrés	Después del estrés
<i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515	46.07 µg/ml	60.29 µg/ml (Ampicilina)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	53.18 µg/ml	51.46 µg/ml (Tetraciclina)

<i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD-1	26.35 µg/ml	51.30 µg/ml (Ampicilina)
---------------------------------------	-------------	-----------------------------

Por medio de la electroforesis de proteínas se evidencia en los tres primeros carriles que posiblemente se sintetizan las proteínas GroEL/GroES (60 y 10 kDa respectivamente) bajo el estrés inducido por el antibiótico. Este resultado se puede observar en la Figura 7 donde se nota tenuemente la presencia de bandas.

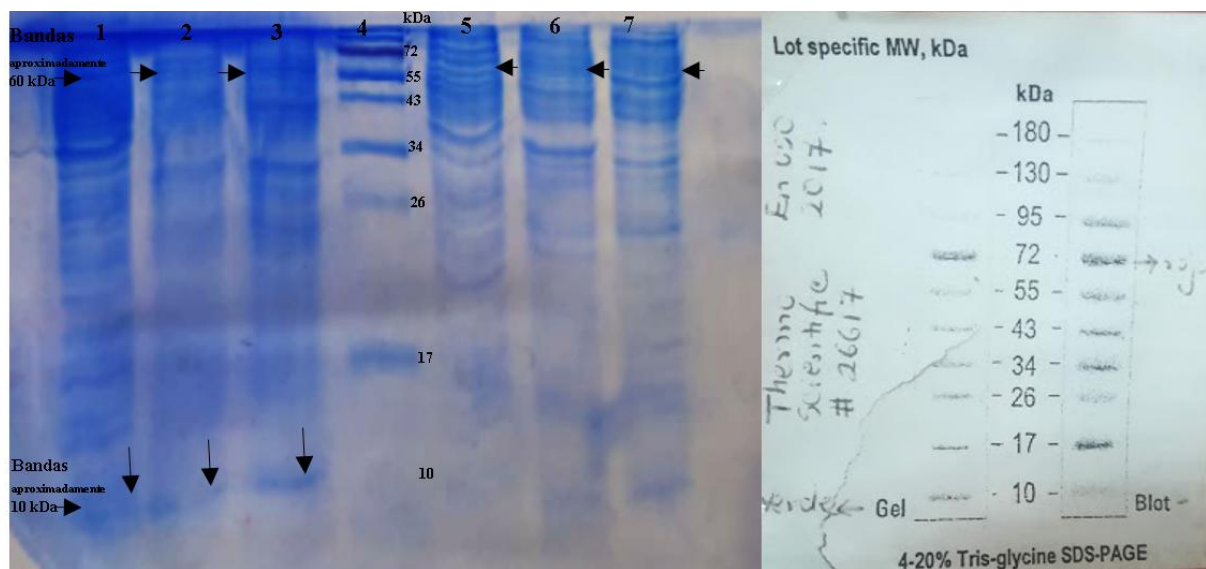


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Carril 1. *P. extremaustralis* CMPUJ U515 estresada con 10 µg/mL de ampicilina. Carril 2. *B. subtilis* ATCC 6633 estresada con 1 µg/mL de tetraciclina. Carril 3. *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 estresada con 1 µg/mL de ampicilina. Carril 4. Marcador de peso molecular Thermo Fisher Scientific 26617. Carril 5-7. *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 sin estrés.

8 DISCUSIÓN

Los genomas de las cepas en estudio *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, tienen hasta un 25% de proteínas sin caracterización funcional. En este trabajo se identificaron proteínas hipotéticas con posible función para la degradación de xenobióticos. Para las secuencias de *P. extremaustralis* CMPUJ U515 WP 085040859.1, PRD17982, OHC32105.1, WP 127672052.1, y OHC34248.1 se predijo que pertenecen a las oxigenas del grupo oxidoreductasa, siendo una

enzima que oxida los sustratos transfiriendo un átomo de oxígeno a partir del oxígeno molecular (O_2), y de utilizar FAD / NADH / NADPH como cosustrato (80). Microorganismos que contienen esta enzima tienen la capacidad de recuperar suelo y agua contaminados por hidrocarburos, como se evidencia en los resultados obtenidos por Mukherjee et al. (81), donde *P. aeruginosa* tiene el gen *alkB* que codifica la enzima monooxigenasa, junto con los genes C12O, C23O y PAH-RHD α que codifican la enzima dioxigenasa, permitiendo así la degradación del hidrocarburo pireno en 30.1% después de 144 horas de incubación a pH 6,5, 37°C (81). En los resultados de Tribelli et al. (82) y Vásquez et al. (26), se evidencia que *P. extremaustralis* degrada alcanos ya cuando ha estado en contacto con este contaminante, como el diésel, ya que posee la enzima 1-alcanó-moxigenasa codificada por el gen *AlkB*, la cual comienza a degradar por oxidación de un grupo metilo terminal generando un alcohol primario, que posteriormente se oxida a un aldehído y luego a un ácido graso, este último es oxidado por una β -oxidación para generar acetil-CoA, permitiendo degradación del diesel a los 7 días (82) (26). En el trabajo realizado por Zucoloto et al. (83) se encontró actividad enzimática por medio de detección por fluorescencia de las monooxigenasas en *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp* y *B. thuringiensis*, cepas que fueron aislados en drenajes de minas de cobre (83). *P. extremaustralis* CMPUJ U515 posee genes que codifican para proteínas hipotéticas relacionadas a oxigenasas, en tanto no se evidenció proteínas hipotéticas asociadas a oxigenasas en *B. subtilis* y *B. thuringiensis*. Otros trabajos dan cuenta de que cepas de *B. subtilis* y *B. thuringiensis* poseen genes codificantes de este tipo de enzimas, por lo cual un análisis de los genomas de las cepas de este trabajo podría arrojar que si tienen la capacidad degradadora por medio de esta clase de enzima (83).

Las proteínas hipotéticas relacionadas con las enzimas PIF48157.1 y WP 105818841.1 solo se identificaron en *P. extremaustralis* CMPUJ U515, las cuales son peroxidasas. Estas enzimas usan varios peróxidos como aceptores de electrones permitiendo así la catalización de una serie de reacciones oxidativas (84). Estas enzimas se encuentran presentes en *P. aeruginosa* ATCC 19154 y *Serratia marcescens* NCIM 2919 como se evidencio en los ensayos de Chang et al. (85). Al igual que en *Bacillus sp.* gracias a la lignina peroxidasa (85). Las lignina peroxidasas por lo general son más eficientes a las generadas por los basidiomicetos, los cuales degradan la lignina (84). En este trabajo a pesar que no se evidencia enzimas hipotéticas con posible función de peroxidasas para *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, el género *Bacillus* si expresa estas proteínas que permitirían ser utilizadas en la biorremediación.

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis en los enlaces éster carboxílico (86). La proteína hipotética con posible función de lipasa OHC34561.1, la cual solo se identificó en *P. extremaustralis* CMPUJ U515. En el trabajo realizado por López et al. (24) se encontró que la cepa *P. extremaustralis* CMPUJ U515 presenta el gen *lip515A* codificante de una lipasa, además utilizó como únicas fuentes de C a Tween 80, tributirina, trioleína, tricaprilina y aceite de oliva (24). *P. extremaustralis* CMPUJ U515 puede ser potencial biorremediador de entornos contaminados por aceites y grasas.

Es importante tener en cuenta que la determinación de la posible función de enzimas hipotéticas se llevó a cabo por la comparación realizada con el programa tBLASTn contra la base de datos de nucleótidos y proteínas del NCBI para las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, es por lo anterior que se sugiere que en próximos estudios se haga uso de otros recursos bioinformáticos como GO FEAT 1.0 (87) permitiendo realizar anotación funcional usando bases de datos como Uniprot (88), la anotación del genoma, dominio y familia con InterPro (89) y Pfam (12). También se puede identificar dominios conservados en la base CDART (90) y SMART 8.0 (91), y por último gracias a las bases de datos Pfam 31.0 (12), SUPERFAMILY 1.75 (13) y SVMProt (92), se puede realizar una clasificación por familias funcionales de las proteínas hipotéticas, en relación a la similitud, como se evidencia en los resultados obtenidos por Oliveira et al. (54). Determinar la función de una proteína está relacionado con su localización, y con las herramientas PSORTdb 3.0 (93) y CELLO 2.5 (94) se puede determinar, por ejemplo si una proteína se encuentra ubicada en citoplasma, su posible función sería de biosíntesis o de transporte, como se evidencia en el estudio de Lee et al (95), donde se hizo uso de PSORTdb en la cepa de *E. coli* K-12, donde se catalogó 808 proteínas de membrana interna (95). También es importante predecir los parámetros fisicoquímicos por medio de la herramienta ProtParam (96), incluyendo masa molecular, punto isoeléctrico teórico (pI), la composición de aminoácidos, la composición atómica, el coeficiente de extinción, el índice de inestabilidad, el índice alifático, entre otros, como se observa en la investigación de Kathera et al. (97), por ejemplo el índice alifático de una proteína se asocia con la termoestabilidad de la misma (54).

Es clave resaltar la importancia de inferir la función de una proteína por medio del análisis de la red de interacción proteína- proteína, ya que la función de una proteína depende de la interacción reguladora y contacto con otra proteína. Este análisis se puede realizar gracias a STRING 10.5 (98) que asocia la relación directa (física) e indirecta (funcional) de una proteína, posterior a la verificación de similaridad con BLAST (99). También se puede

realizar el método de mapeo interológico descrito por Folador et al. (100), en el cual la interacción identificada es transferida al mapa del microorganismo permitiendo así suponer que si dos proteínas interactúan, los pares ortólogos también lo harían (100).

Es importante evaluar en próximos estudios con las cepas de estudio, el desempeño del análisis bioinformático realizado, ya que la precisión de la predicción estadística permite validar los resultados obtenidos, como fue en el caso de Shahbaaz et al. 2013 (101), donde los parámetros generados le arrojaron una precisión promedio de 96.25% indicando así que los resultados son confiables y pueden usarse para próximas investigaciones gracias a ROC, un método utilizado para analizar y comparar la precisión diagnóstica.

Para reconocer las estrategias de adaptación frente al estrés se puede realizar identificando la expresión de los genes involucrados en la degradación de xenobióticos por medio de un análisis transcriptómico de las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1. Para determinar el perfil de expresión de ARN, se puede realizar una secuenciación del ARN (RNA-seq) por medio de la plataforma Illumina HiSeq2000 y analizarla por el software Rockhopper (102), que permite identificar genes expresados clasificándolos por una categoría funcional. Para reconocer la sobreexpresión de los genes analizados por el software Rockhopper, se utilizará el software Blast2GO (103) con la categoría GO (ontología génica) a la secuencia del genoma y a los genes expresados. Para validar RNA-seq se realiza RT qPCR, como lo realizaron Tribelli et al. (23), permitiéndoles obtener nuevos hallazgos involucrados en la adaptación al frío de *P. extremaustralis*, lo que alude por primera vez un rol de la vía de oxidación del etanol para el crecimiento bacteriano a bajas temperatura (23). Este análisis transcriptómico, permitirá estudiar la expresión de genes en los microorganismos de estudio, estimando la abundancia en condiciones específicas de su desarrollo o fisiológicas, se pretende evidenciar si las proteínas hipotéticas con posible función se expresan al estar en contacto con un xenobiótico.

El uso de microorganismos permite llevar a cabo la transformación de contaminantes gracias a sus enzimas (104). La transformación bacteriana del glifosato se realiza por dos vías principales, la vía AMPA(ácido aminometilfosfónico) y la vía de la Sarcosina o C-P liasa, en relación a la función del grupo químico hidrolizado (8). En el análisis realizado con el programa BLAST usando la secuencia GU214711.1(glifosato oxidorreductasa-GOX) de GenBank (73), a las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, se evidencia que hay secuencias similares en estos genomas (Tabla 5), indicando así que *P. extremaustralis* CMPUJ U515 si contiene la enzima GOX involucrada en la vía AMPA. Es importante resaltar que el glifosato es mejor fuente de

fosforo que de carbono, sin embargo, algunas especies de *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* lo utilizan como fuente de carbono, evidenciándose en el trabajo realizado por Moneke et al. 2010 (107) y Martínez et al. (108), sin tener claro cuál enzima fue utilizada, GOX o GO. Fan et al. (109) identificaron que *B. cereus* CB4 tiene la capacidad de degradar el glifosato por la vía AMPA (Figura 8) (109).

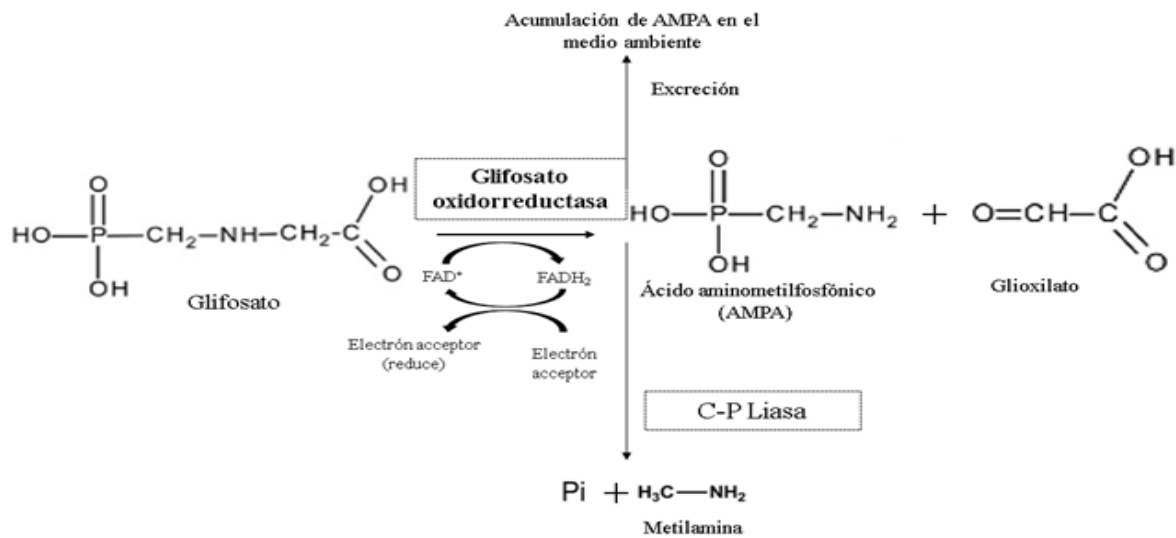


Figura 8. Metabolismo bacteriano del glifosato a través de la vía AMPA catalizada por la enzima GOX (106).

En los ensayos cualitativos realizados a *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, en medio MSM con glifosato Roundup® 747 SG, se encontró que este último no fue tomado como única fuente de carbono, incluyendo a *P. extremaustralis* CMPUJ U515 que posee una secuencia codificante con similaridad a la enzima GOX. Existen otras enzimas que transforman el glifosato produciendo AMPA y glioxilato como lo es la glicina oxidasa (EC 1.4.3.19) teniendo en cuenta que su actividad oxidativa es diferente a GOX (110). Es por lo anteriormente dicho que se puede especular que estas oxidorreductasas al no ser semejantes en estructura, ni tienen un sustrato específico, ni en homología, permiten llamarlas glifosato oxidorreductasas (110). Es probable que estas cepas puedan usar el glifosato como única fuente de carbono en otras concentraciones, o en un proceso que se evidenciaría en un tiempo más largo (tolerancia).

La enzima glicina oxidasa (GO) codificada por el gen *thiO*, es una flavoproteína oxidasa conformada por cuatro subunidades idénticas, la cual contiene una molécula de FAD con unión no covalente (74) (111). Su actividad enzimática es poco específica en relación al

sustrato ya que puede oxidar sarcosina y glicina, incluso éster de etilglicina, d -2-aminobutirato, N- metil- d-alanina y glifosato según el estudio realizado por Pedotti et al. 2009 (74). La enzima GO cataliza el enlace carboximetileno-nitrógeno produciendo glioxilato y AMPA, y a diferencia de la enzima GOX se genera peróxido de hidrógeno (Figura 10) (74).

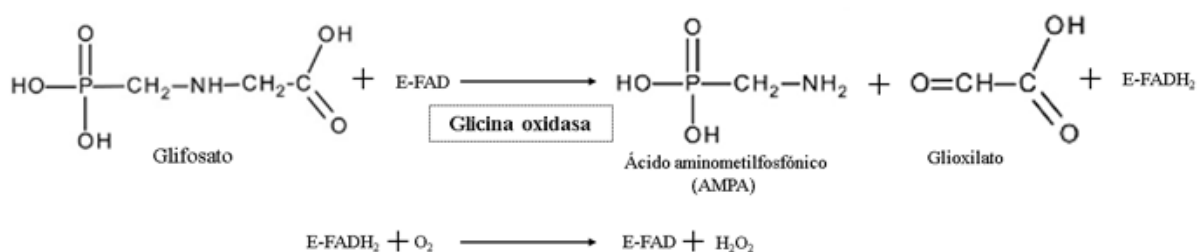


Figura 9. Metabolismo bacteriano del glifosato a través de la vía AMPA catalizada por la enzima GO (105).

En la comparación realizada con BLAST usando la secuencia de la enzima GO (EC_1.4.3.19) (74) contra los genomas de las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, se evidencia las dos primeras poseen secuencias de ADN similares que codificarían para la enzima glicina oxidasa (GO). Iyer et al. (112) realizaron análisis filogenético de la enzima GO, el cual revela que ninguna de las cepas de su estudio, que incluye a *P. stutzeri* ODKF13, y *P. putida* CBF10, compartió más del 50% de similitud, y al realizar el análisis entre *B. subtilis* y *B. cereus*, sus GO comparten solo un 33% de similitud a nivel proteómico (112). Es decir, que al igual que GOX, GO al no ser semejante en estructura o en sustrato, en cada microorganismo se podría encontrar una versión de GO diferente que realiza la hidrólisis del enlace carboximetileno-nitrógeno en el glifosato.

En los ensayos cualitativos en medio MSM, *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, no utilizan el glifosato Roundup® 747 SG como única fuente de carbono, aunque las dos primeras tienen secuencias asociadas a la enzima GO. Pedotti et al. (74) demuestran la actividad de GO sobre glifosato por parte de *B. subtilis*, la cual fue evidenciada después de añadir esta enzima a una solución de 5mM de glifosato en la cámara de un oxímetro, evidenciándose la disminución de oxígeno, lo cual indica que la actividad llevada a cabo por esta enzima genera peróxido de hidrógeno (74).

Estudios previos han demostrado que el género *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.* tiene la capacidad de tomar el glifosato como única fuente de carbono (73). *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 no utilizaron glifosato Roundup® 747 SG como única fuente de carbono. Fan et al. (109) escribieron un artículo donde se describe que *B. cereus* CB4 utilizó el glifosato en un 97% a concentraciones desde 6 g/L hasta 12 g/L evidenciándose que degradó el glifosato a AMPA, glioxilato, sarcosina, glicina y formaldehído, donde el pH con mejor adaptación para la cepa *B. cereus* fue de 6.0 - 7.0 y donde a pH ácidos el crecimiento era inhibido (109), al igual que lo reportado por Shu et al. (113) en degradación de aflatoxina B 1 por *B. velezensis* DY3108, concordando con los parámetros realizados para el pH de 7.0 utilizado para las tres cepas de estudio.

Fan et al. (109) primero inocularon un caldo a las concentraciones de 6 g/L de glifosato en MSM por 2 días, hasta llegar a una D.O de 0.5 a 600nm. Es posible que las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 posiblemente no lograron degradar el glifosato puesto que sería necesario un periodo de adaptación a las condiciones nutricionales para que pudieran hacer uso de este como única fuente de carbono. La concentración utilizada en este trabajo fue de 6 g/L de glifosato al igual que Fan et al. (109) y Méndez 2015 (76), con *B. cereus* CB4 y la muestra 1 C (M1C) respectivamente, encontrando que se da una mejor capacidad de degradar el glifosato, puesto que al aumentar su concentración se inhibe la degradación. Es posible que las cepas de este estudio puedan degradar glifosato a concentraciones menores. Fan et al. (109), demuestran que la cantidad del inóculo no es determinante para que ocurriera la degradación.

Las temperaturas que utilizaron en el estudio de Fan et al. (109) estuvieron entre 25, 30, 35 y 40°C, donde a 35°C la cepa *B. cereus* CB4 creció y degradó el glifosato. En esta investigación se incubó a 30°C, incluyendo a *P. extremaustralis* CMPUJ U515 ya que su rango de crecimiento va desde 4 - 35 ° C y su crecimiento óptimo es a 30°C (24), pero para degradar el glifosato requiere de estudio de esta variable, al igual que para *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1. Además, se puede determinar la tasa de degradación por medio de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) así como se realizó en la investigación de Méndez (76).

La vía de la C-P liasa, es la ruta que se ha identificado en Gram positivos como *Arthrobacter sp.* y *Streptomyces sp.* y en Gram negativos como *Achromobacter sp.*, *Rhizobium meliloti* y *Pseudomonas sp.* en suelo, los cuales degradan el glifosato por medio de la enzima C-P liasa generando una escisión del enlace C-P formando como producto de

degradación *N*- metilglicina (Sarcosina) y una molécula de P (8). La *N*- metilglicina en presencia de dioxígeno puede convertirse en peróxido de hidrógeno, formaldehído y glicina (Figura 11) (8).

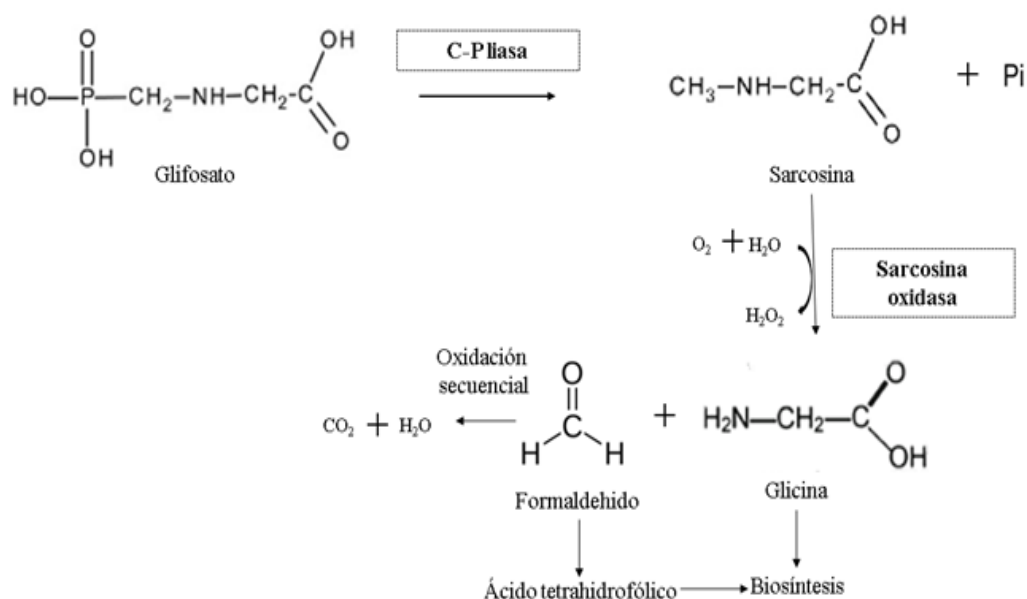


Figura 10. Metabolismo bacteriano del glifosato a través de la vía C-P liasa catalizada por la enzima C-P liasa (106).

Se debe considerar que existen cuatro enzimas que tienen la capacidad de catalizar el enlace C-P: fosfonoacetaldehído hidrolasa (NP_250002.1), fosfonoacetato hidrolasa (AAC15507.1), fosfonopiruvato hidrolasa (AAO24736.1) y C – P liasa (NP_418522.1), pero solo esta última tiene la capacidad de romper el enlace estable carbono- fosforo del glifosato, el cual es resistente a fotólisis y quimiólisis (75) (73). La enzima C-P liasa estudiada en *E. coli*, hace parte de un sistema enzimático, dependiendo así de los 14 productos genéticos, codificados por el operón *phn*, donde sus productos catalizan la escisión del enlace C-P (75). Estas proteínas están relacionadas al transporte de organofosfatos, regulación, funciones auxiliares y la enzima C-P liasa que permiten la catalización del enlace C-P (75). El operón *phnCDEFGHIJKLMNOP*, está regulado por el sistema de señalización Pho donde solo se expresa bajo la inanición de P (106). Estudios previos sugieren que *phnCDE* forman un transportador de fosfonato, siendo estos el sistema de transporte ABC, donde PhnC es un polipéptido de unión a ATP, PhnD es una proteína de unión periplásmica para ácidos fosfónicos y PhnE es un polipéptido que atraviesa la membrana (114) (8). Se cree que *phnF* y *phnO* son genes reguladores, donde *phnF* posiblemente regula negativamente la expresión

de un sistema de transporte de P (115) (114). Se estima que *phnGHIJKLM* podrían formar la enzima C-P liasa, que sería lo mínimo para la escisión del enlace C-P (116) (114). Se sugiere que PhnG, H y I son componentes de purina ribonucleósido trifosfato fosfonilasa, PhnJ sería la C-P liasa, PhnK y PhnL serían unas proteínas accesorias. El gen *phnN* codifica ribosil 1,5-*bis* fosfato fosfocinasa, el gen *phnO* codifica aminofosfonato *N*- acetiltransferasa, mientras que *phnP* codifica la fosfodiesterasa cíclica de fosforibosil (116). Lo anteriormente dicho se puede observar en la figura 12 donde se esquematiza la ubicación y organización de los polipéptidos codificados en el operón *phn*.

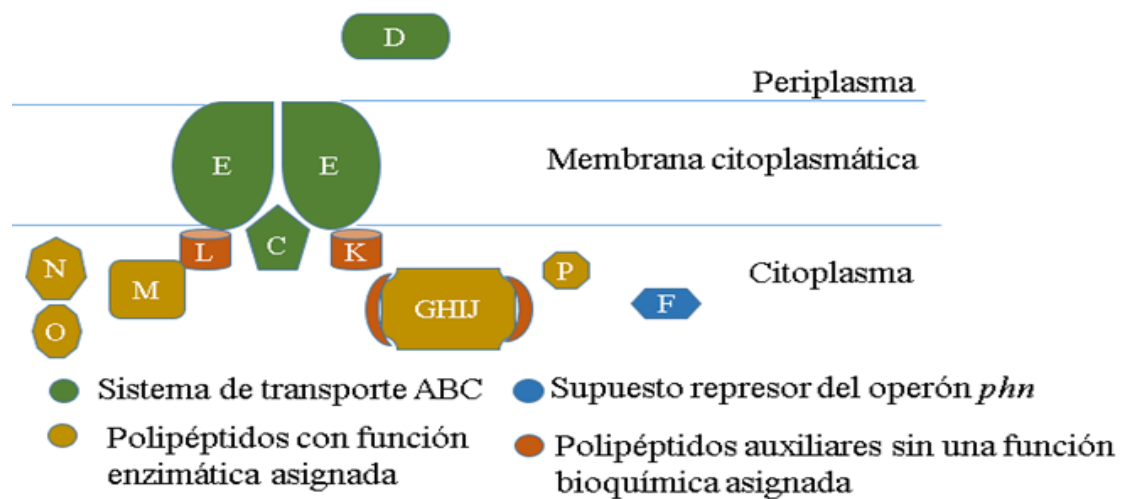


Figura 11. Ubicación y organización propuesta de los polipéptidos codificados en el operón *phn* (8).

Con el siguiente código de acceso para la C-P liasa (NP_418522.1) (75) se realizó el análisis BLAST a las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 (Tabla 5), donde ninguna de las cepas de estudio cumple los parámetros asignados del valor de corte $E < 8e-17$, identidad $>40\%$ y cobertura $>83\%$. En el trabajo realizado por Hove-Jensen et. al (8) se menciona que varias cepas de *Pseudomonas sp*, tal como *Pseudomonas* cepa PG2982, utilizan el glifosato como única fuente de P, sin embargo, en el estudio realizado por White et. al 2004 (117) revela que *P. stutzeri* no puede utilizar glifosato como fuente de fosforo, a pesar de poseer dos operones diferentes que codifican C-P liasa, *phnCDEFGHIJKLMNP* y *htxABCDEFGHIJKLMN* (117). Los genes *phnCDE* y *htxBCD* posiblemente codifican sistemas de transporte ABC para fosfonato, mientras que los 10 genes restantes de cada operón (*phnFGHIJKLMNP* y *htxEFGHIJKLMN*)

codifican polipéptidos que son homólogos a los codificados por el operón *phnFGHIJKLMNP* en *E. coli* (117). Los genes asociados a la ruta de la C-P liasa se expresan en concentraciones altas de glifosato, y a pesar de tener baja cinética para este compuesto es posible que el microorganismo en condición *in situ* se adapte y tenga la capacidad de expresar el sistema enzimático que le permita tomar el glifosato como fuente de P (8).

El plegamiento de las proteínas celulares está mediado por el sistema de chaperonas las cuales permiten la viabilidad celular (118). En este estudio se evaluó la sensibilidad antibacteriana con tetraciclina y ampicilina a través del método de difusión en disco y el método de macrodilución en medio Müller-Hinton, permitiendo determinar cuál sería la concentración mínima inhibitoria (CMI) (figura 4). Posteriormente se estresa los microorganismos para la expresión de las proteínas de choque térmico, en medio Trypticase soya con esta CMI incubando por 24 horas (Figura 4) y realizando la extracción de proteínas totales, las cuales se cuantifican por el método Bradford (Figura 6) permitiendo así llevar a cabo la electroforesis de proteínas SDS-PAGE (Figura 7) identificando la chaperona GroEL (Cpn60) y su cofactor GroES (Cpn10). En este estudio, uno de los antibióticos utilizados fue la ampicilina perteneciente a la familia de los beta-lactámicos, siendo este una penicilina semisintética utilizada para bacterias Gram positivas y Gram negativas, la cual interactúa con la membrana de la porina inespecífica externa F(OmpF) de las Gram-negativas, inhibiendo la síntesis de la pared celular al no permitir la formación de la capa de peptidoglicano y uniéndose a las proteínas fijadores de penicilina, generando el daño de la pared celular y llevando así a la lisis celular (119). El otro antibiótico utilizado es la tetraciclina, un antibiótico de amplio espectro utilizado para Gram positivas y Gram negativas donde su mecanismo de acción está dirigido a inhibir la síntesis de proteínas al evitar la unión del aminoacil-ARNt al sitio aceptor ribosómico (120). La cepa *P. extremaustralis* CMPUJ U515 es sensible a ampicilina hasta la concentración de 12.5 µg/mL (Figuras 3 y 4), por tal motivo se decide estresar este microorganismo a la concentración de 10 µg/mL de ampicilina permitiendo evidenciar la posible expresión de la chaperona GroEL (60 kDa) y el cofactor GroES (10 kDa) (Figura 7). En la investigación realizada por López et al. (24) esta cepa también fue sensible a imipenem, piperacilina, ticarcilina, meropenem, levofloxacina, ceftriaxona, cefoxitina y ceftazidima, y fue resistente la penicilina, colistina o polimixina E y nitrofurantoína (24).

B. subtilis ATCC6633, no es sensible a ampicilina y es por ese motivo se realizó la prueba de susceptibilidad con tetraciclina. Se observa en las Figuras 3 y 4 que su sensibilidad fue de 0.8 µg/mL de tetraciclina, es por esa razón que se utilizó 1 µg/mL. La resistencia

observada al antibiótico ampicilina podría deberse a disminución de la permeabilidad de la membrana, generando una acumulación mínima del antibiótico (121). Para la cepa *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, se evidencia sensibilidad a tetraciclina (Figuras 3 y 4) con 3.1 µg/mL, pero se decide utilizar 1 µg/mL para estresar estos microorganismos e identificar la presencia de chaperonas.

En la Figura 7, para *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 se estima que posiblemente expresaron las proteínas de choque térmico identificándose dos bandas para GroEL (60 kDa) y GroES (10 kDa) después de tener un estímulo estresante por medio de ampicilina y tetraciclina. Cuando un microorganismo se encuentra expuesto a un estrés ambiental se puede generar la desnaturalización de proteínas. Por esa condición de estrés la célula sobreexpresa algunas proteínas de choque térmico como GroEL/GroES, favoreciendo la resistencia al estrés ambiental permitiendo mantener la integridad celular y el metabolismo. Para que estas chaperonas realicen su función ayudando en la respuesta de daño celular por medio del plegamiento de las proteínas necesitan de la cooperación de ATP (122). Este estudio fue realizado teniendo en cuenta diferentes concentraciones de los antibióticos que permitieran generar estrés pero sin eliminar el microorganismo, como en el estudio realizado por Tribelli et al. 2015 (23) donde se identifica las proteínas GroES y GroEL de *P. extremaustralis* que fueron reprimidas al ser sometidas al estrés inducido a una temperatura de 8°C, pero no a 30°C (23), o el estudio de Seydlová et al. 2012 (39) donde las proteínas GroES y GroEL fueron expresadas a un estímulo de etanol 3% pero a 7% ya fue inhibido, en una cepa de *B. subtilis*. Estos resultados de las proteínas GroES y GroEL, pueden también identificarse gracias a un análisis cuantitativo como el de Tribelli 2015 (23), realizando el perfil de la expresión de ARN en *P. extremaustralis* después de ser estresada a una temperatura de 8°C y 30°C, extrayendo ARN total, realizando la secuenciación del ARNm (RNA-seq) y analizado por la herramienta Rockhopper (102), y por último se validó con RT-qPCR (23). Mientras que en el estudio de *B. subtilis* después de estrés por etanol a corto plazo realizado por Seydlová et al. 2012 (39), se identificaron estas proteínas gracias a la determinación del crecimiento de bacterias estresadas por etanol a una DO 410 nm durante 30 minutos, a diferentes concentraciones de etanol. Liu et al. 2018 (122) analizaron la expresión del ARNm relacionado a groEL por medio de RT-qPCR después de hacer extracción de ARN total en situación de estrés como el choque térmico, ácido, sal base y estrés oxidativo con peróxido de hidrogeno (122). Es clave mencionar que Ambily et al. 2011 (123), en su estudio menciona que las proteínas de choque térmico son únicas, siendo la expresión de las mismas una característica común en la resistencia al estrés siendo un

mecanismo observado a diferentes temperaturas, salinidad, pH, presión, estrés oxidativo, o radiación, por ejemplo, evidenciándose la aparición de proteínas de choque térmico de 60 y 70 kDa (123). Piper et al.2012 (124), identifican que desde el hábitat natural de los microorganismos se encuentran expuestos a algunos mecanismos de estrés a causa de fármacos de actinomicetos como *Streptomyces spheroides* los cuales su objetivo es unirse dentro del sitio de unión de ADP/ATP de la chaperona inhibiéndola, pero esta misma interacción natural planta- patógeno, planta-hongo puede generar cambios en los aminoácidos en el sitio de unión ADP/ATP evidenciándose así que estos inhibidores pueden causar una fuerte activación a la respuesta al estrés generado un aumento en los niveles celulares de proteínas de choque térmico que median la supervivencia antiapoptótica de la bacteria (124).

9 CONCLUSIONES

1. Se ha identificado que algunas de las proteínas hipotéticas de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 podrían tener una posible función de degradación de xenobióticos.

2. Las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 no utilizaron glifosato Roundup® 747 SG como única fuente de carbono. *P. extremaustralis* CMPUJ U515 posee la enzima GOX y GO y *B. subtilis* ATCC 6633 la enzima GO, donde estas enzimas tienen la capacidad de degradar el glifosato vía AMPA. *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 no poseen la enzima C-P liasa.

3. Las cepas de estudio *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 posiblemente sintetizan las proteínas GroEL/GroES (60 y 10 kDa respectivamente) bajo el estrés inducido por el antibiótico.

10. Recomendaciones

Se sugiere para futuras investigaciones la caracterización de la biodegradación de glifosato con diferentes variables como pH, inóculo, concentración del glifosato, o tiempo de incubación.

En un próximo estudio, se puede analizar cuantitativamente la expresión de los genes groEL/groES

11. Bibliografía

1. Singh A., Chaudhary S., Dubey B., Prasad V. Microbial-Mediated Management of Organic Xenobiotic Pollutants in Agricultural Lands. *Plant Responses to Xenobiotics*. 2016, págs. 211-230.
2. Arias E V, Rodriguez AR , Bardos P , Naidu R. Contaminated land in Colombia: A critical review of current status and future approach for the management of contaminated sites. *Science of The Total Environment*. 2018, Vol. 618, págs. 199-209.
3. Panorama de biorremediación en Colombia . *Invermar*.
4. Gomez LE, Henao A. La problemática de los plaguicidas en Colombia. *Caso Roundop- Arma binaria de guerra* . 2017, Vol. 1.
5. Satapute P, Paidi MK, Kurjogi M, Jogaiah S. Physiological adaptation and spectral annotation of Arsenic and Cadmium heavy metal-resistant and susceptible strain *Pseudomonas taiwanensis*. *Environmental Pollution*. Agosto de 2019, Vol. 251, págs. 555-563.
6. Errington J., Wu LJ. Cell Cycle Machinery en *Bacillus subtilis*. *Subcellular Biochemistry*. 2017, Vol. 84, págs. 45-65.
7. Almeida AL, Soccol VT y Soccol CR. *Bacillus thuringiensis* : mecanismo de acción, resistencia y nuevas aplicaciones: una revisión. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016, Vol. 36, págs. 317-326.
8. Hove-Jensen B, Zechel DL and Jochimsen B. Utilization of Glyphosate as Phosphate Source: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2014, Vol. 74, págs. 176-197.
9. Desler C, Suravajhala P, Sanderhoff M, Rasmussen M and Rasmussen LJ. In Silico screening for functional candidates amongst hypothetical proteins. *BMC Bioinformatics*. 16 de Septiembre de 2009, pág. 289.
10. Ijaq J, Malik G, Kumar A. et al. A model to predict the function of hypothetical proteins through a nine-point classification scoring schema. *BMC Bioinformatics* . 2019, Vol. 14.
11. Bateman A, Coggill P and Finn RD. DUFs: families in search of function. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2010, págs. 1148-1152.
12. Finn RD 1, Bateman A , Clements J , Coggill P , Eberhardt RY. et al. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research*. 2014, Vol. 42.
13. Gough J, Karplus K , Hughey R and Chothia C. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *Journal of Molecular Biology*. 2001, Vol. 313.
14. Hanson AD, Pribat A , Waller JC , and Crécy-Lagard V . 'Unknown' proteins and 'orphan' enzymes: the missing half of the engineering parts list--and how to find it. *Biochem J*. 2009, pág. 425.
15. FT, Techtmann SM y Robb. Archaeal-like chaperonins in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, Vol. 47.
16. Weiss C, Jebara F, Nisemblat S, and Azem A. Dynamic Complexes in the Chaperonin-Mediated Protein Folding Cycle. *Frontiers in molecular biosciences*. 2016, Vol. 3.
17. Mulder, Gaston K. Mazandu and Nicola J. Function Prediction and Analysis of Mycobacterium tuberculosis Hypothetical Proteins. *Int J Mol Sci*. 2012, págs. 7283-7302.

18. Aislabie J, Saul DJ and Foght JM . Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremófilos*. 2006, Vol. 10, 3, págs. 171-179.
19. Javaid MK, Ashiq M, Tahir M. Potential of Biological Agents in Decontamination of Agricultural Soil. *Scientifica (Cairo)*. 2016.
20. Rayu S, Nielsen UN, Nazaries L, Singh BK. Isolation and Molecular Characterization of Novel Chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol-degrading Bacteria from Sugarcane Farm Soils. *Front Microbiol*. 2017.
21. López NI, Pettinari MJ, Stackebrandt E, Tribelli PM, Pötter M, Steinbüchel A and Méndez BS. *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) producer isolated from an antarctic environment. *Current Microbiology*. 2009, Vol. 59, págs. 514-519.
22. Raiger Iustman LJ, Tribelli PM, Ibarra JG, Catone MV, Solar Venero EC and López NI. Genome sequence analysis of *Pseudomonas extremaustralis* provides new insights into environmental adaptability and extreme conditions resistance. *Extremófilos*. 2015, Vol. 19, 1, págs. 207-220.
23. Tribelli PM, Solar EC, Ricardi MM, Gómez M, Raiger LJ, Molin S, and López NI. Novel Essential Role of Ethanol Oxidation Genes at Low Temperature Revealed by Transcriptome Analysis in the Antarctic Bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *PLoS One*. 2015.
24. López G, Diaz C, Shapiro N, Woyke T, Kyrpides NC, Alzate JD, González LN, Restrepo S, and Baena S. Draft genome sequence of *Pseudomonas extremaustralis* strain USBA-GBX 515 isolated from Superparamo soil samples in Colombian Andes. *Stand Genomic Sci*. 2017.
25. NI, Tribelli PM and López. Reporting Key Features in Cold-Adapted Bacteria. *Life (Basel)*. 2018.
26. Vásquez F, Higuera S, Pavlov MS, Marshall SH, Olivares PJ. Phylogenetic MLSA and phenotypic analysis identification of three probable novel *Pseudomonas* species isolated on King George Island, South Shetland, Antarctica. *Braz J Microbiol*. 2018.
27. Colonnella MA, Lizarraga L , Rossi L., Díaz R , Egoburo D , López NI , Iustman LJR. Effect of copper on diesel degradation in *Pseudomonas extremaustralis*. *Extremophiles*. 2019.
28. Huang Y, Xiao L , Li F , Xiao M , Lin D, Long X , Wu Z . Microbial Degradation of Pesticide Residues and an Emphasis on the Degradation of Cypermethrin and 3-phenoxy Benzoic Acid: A Review. *Molecules*. 2018.
29. Doolotkeldieva T, Konurbaeva M, Bobusheva S. Microbial communities in pesticide-contaminated soils in Kyrgyzstan and bioremediation possibilities. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018, Vol. 25.
30. PK, Arora. Decoloración del 4-cloro-2-nitrofenol por una bacteria del suelo, *Bacillus subtilis* RKJ 700. *PLOS ONE*. 2012.
31. Joo, M.H. & Kim, J.Y. J Korean. Characteristics of crude oil biodegradation by biosurfactant-producing bacterium *Bacillus subtilis* JK-1. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2013, Vol. 56, págs. 193-200.
32. Sakthipriya N, Doble M and Sangwai JS. Bioremediation of Coastal and Marine Pollution due to Crude Oil Using a Microorganism *Bacillus subtilis*. *Procedia Engineering*. 2015, Vol. 116, págs. 213-220.
33. Montagnolli RN, Lopes PR and Bidoia ED. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. *Environ Monit Assess*.

34. Xiao Y, Chen S, Gao Y, Hu W, Hu M, Zhong G. Isolation of a novel beta-cypermethrin degrading strain *Bacillus subtilis* BSF01 and its biodegradation pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, Vol. 99.
35. Safdari, MS., Kariminia, HR., Ghobadi Nejad, Z. et al. Study Potential of Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in Bioremediation of Diesel-Contaminated Water. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2017.
36. Tabari, K. & Tabari, M. Int. J. Environ. Sci. Technol. Characterization of a biodegrading bacterium, *Bacillus subtilis*, isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2017, Vol. 14, págs. 2583-2590.
37. Abdelhaleem HAR, Zein HS, Azeiz A, Sharaf AN, Abdelhadi AA. Identification and characterization of novel bacterial polyaromatic hydrocarbon-degrading enzymes as potential tools for cleaning up hydrocarbon pollutants from different environmental sources. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2019, Vol. 67, págs. 108-116.
38. Shi L, Ravikumar V, Derouiche A, Macek B and Mijakovic I. Tyrosine 601 of *Bacillus subtilis* DnaK Undergoes Phosphorylation and Is Crucial for Chaperone Activity and Heat Shock Survival. *Frontiers in Microbiology*. 2016, Vol. 7.
39. Seydlová G, Halada P, Fišer R, Toman O, Ulrych A, and Svobodová J. DnaK and GroEL chaperones are recruited to the *Bacillus subtilis* membrane after short-term ethanol stress. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, Vol. 112.
40. Venkata Subba Reddy Gangireddygar, Praveen Kumar Kalva, Khayaalethu Ntushelo, Manjunatha Bangeppagari, Arnaud Djami Tchatchou y Rajasekhar Reddy Bontha. Influence of environmental factors on biodegradation of quinalphos by *Bacillus thuringiensis*. *Environmental sciences Europe*. 6 de marzo de 2017.
41. Mandal K, Singh B, Jariyal M y V.K. Gupta. Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1 July 2013, Vols. Volume 93,, págs. 87-92.
42. Chen S, Deng Y, Chang C. et al. Pathway and kinetics of cyhalothrin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* strain ZS-19. *Scientific Reports*. 2015, Vol. 5.
43. Catone MV, Ruiz JA, Castellanos M, Segura D, Espin G, and López NL. High Polyhydroxybutyrate Production in *Pseudomonas extremaustralis* Is Associated with Differential Expression of Horizontally Acquired and Core Genome Polyhydroxyalkanoate Synthase Genes. *PloS one*. 2 de junio de 2014.
44. GenBank. Genome *Bacillus subtilis*. *National Center for Biotechnology Information*.
45. Earl AM, Losick R, 2 y Kolter R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in microbiology*. 2010.
46. JP, Cuervo. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilización de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. *PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA*. 2010.
47. Almeida AL, Soccol VT y Soccol CR. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016, Vol. 36.
48. Portela DD, Chaparro A y López SA. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *NOVA*. 23 de mayo de 2013.
49. J, Ochoa G y arrivillga. *Bacillus thuringiensis*: Avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti*. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 2009, Vol. 49.

50. JM, Jez. Revisiting protein structure, function, and evolution in the genomic era. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2017, Vol. 142, págs. 11-15.
51. EV, Galperin MY and Koonin. 'Conserved hypothetical' proteins: prioritization of targets for experimental study. *Nucleic acids research*. 2004, Vol. 32, págs. 5452-5463.
52. Shahbaaz M, ImtaiyazHassan MD, y Ahmad F. Functional Annotation of Conserved Hypothetical Proteins from Haemophilus influenzae Rd KW20. *PloS one*. 2013, Vol. 8.
53. Islam S, Shahik S, Sohel, Patwary N, and Hasan MA. In Silico Structural and Functional Annotation of Hypothetical Proteins of Vibrio cholerae O139. *Genomics & informatics*. 2015, págs. 53-59.
54. Oliveira WL, Aragão CL, Maranhão L, Sousa LC, Castro JT, Almeida F and Folador ED. Functional annotation of hypothetical proteins from the Exiguobacterium antarcticum strain B7 reveals proteins involved in adaptation to extreme environments, including high arsenic resistance. *PLoS One*. 2018, Vol. 13.
55. Lubec G, Afjehi-Sadat L, Yang JW and Pradeep JP. Searching for hypothetical proteins: Theory and practice based upon original data and literature. *Progress in Neurobiology*. 2005, Vol. 77, págs. 90-127.
56. Jallow MF, Awadh DG, Albaho MS, Devi VY and Thomas BM. Pesticide Knowledge and Safety Practices among Farm Workers in Kuwait: Results of a Survey. *Int J Environ Res Public Health*. 2017, Vol. 14.
57. Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Tallaa LB, et al. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol*. 2015, Vol. 16, 5.
58. Okonya JS, Petsakos A, Suarez V et al. Pesticide Use Practices in Root, Tuber, and Banana Crops by Smallholder Farmers in Rwanda and Burundi. *Int J Environ Res Public Health*. 2019, Vol. 16.
59. Verma JP, Jaiswal DK and R. Sagar. Pesticide relevance and their microbial degradation: a-state-of-art. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2014, Vol. 13, págs. 429-466.
60. Ambiental, Plan de manejo. Identificación del herbicida glifosato propiedades y toxicidad. *Documento plan de manejo Ambiental Erradicacion de Cultivos ilicitos*. 2000.
61. Information, National Center for Biotechnology. Glyphosate. *PubChem Database*. 2019.
62. Vera MS, LagomarsinoL, SylvesterM, Pérez G et al. New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*. 2010, Vol. 19, 4, págs. 710–721.
63. Annett R, Habibi H and Hontela A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*. 2014, Vol. 34, 5.
64. Gomes MP, Smedbol E, Chalifour A, Hénault-Ethier L, Labrecque M, LepageL, Lucotte M and Juneau P. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany*. 2014, Vol. 65, 17, págs. 4691-4703.
65. F, Massot. Estrategias de rizadorremediacion de glifosato en suelos bajo explotacion agricola intensiva. *Universidad de Buenos Aires*. 2018.
66. A, Valavanidis. Glyphosate, the Most Widely Used Herbicide. Health and safety issues. Why scientists differ in their evaluation of its adverse health effects. 2018, Vol. 1.

67. Mertens M, Höss S, Neumann G , Afzal J y Reichenbecher W. Glyphosate, a chelating agent—relevant for ecological risk assessment? *Environmental science and pollution research international*. 2018, Vol. 25, págs. 5298–5317.
68. Sharma B, Dangi AK , Shukla P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *J Environ Manage*. 2018, Vol. 210, págs. 10-22.
69. Gangola S, Sharma A, Bhatt P, Khati P ,y Chaudhary P. Presence of esterase and laccase in *Bacillus subtilis* facilitates biodegradation and detoxification of cypermethrin. *Scientific reports*. 2018, Vol. 8.
70. Macario EC, Yohda M, Macario A y Robb FT. Bridging human chaperonopathies and microbial chaperonins. *Communications biology*. 2019, Vol. 2.
71. W, Houry. Chaperone-Assisted Protein Folding in the Cell Cytoplasm. *Current Protein & Peptide Science*. 2001, Vol. 2, 3.
72. Macario EC, Robb FT and Macario A. Prokaryotic Chaperonins as Experimental Models for Elucidating Structure-Function Abnormalities of Human Pathogenic Mutant Counterparts. *Frontiers in molecular biosciences*. 2017, Vol. 3.
73. Zhan H, Feng Y, Fan X, Chen S. Recent advances in glyphosate biodegradation. *Applied microbiology and biotechnology*. 2018, Vol. 102.
74. Pedotti M, Rosini E, Molla G, Moschetti T, Savino C, Vallone B, and Pollegioni L. Glyphosate Resistance by Engineering the Flavoenzyme Glycine Oxidase. *Jurnal Biological Chemistry*. 2009, Vol. 284.
75. Villarreal-Chiu JF, Quinn JP, and McGrathJw. The Genes and Enzymes of Phosphonate Metabolism by Bacteria, and Their Distribution in the Marine Environment. *Frontiers in microbiology*. 2012, Vol. 3.
76. AF, Méndez. Aislamiento e identificación de bacterias capaces de degradar glifosato. *Universidad ICESI*. 2015.
77. Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Schrenckenberger P, Woods. G. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas a color. *Pruebas de sensibilidad a los antibióticos*. 6. Buenos Aires : Panamericana, 2006, 17, págs. 902- 974.
78. *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 chromosome, complete genome. *GenBank*. 2019.
79. *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* str. HD-1, complete genome. *GenBank*. 2013.
80. Arora PK, Kumar M, Chauhan A , Raghava G , and Jain RK. OxDBase: a database of oxygenases involved in biodegradation. *BMC Research Notes*. 2009, Vol. 2.
81. Mukherjee AK, Bhagowati P , Biswa BB , Chanda A and Kalita B . A comparative intracellular proteomic profiling of *Pseudomonas aeruginosa* strain ASP-53 grown on pyrene or glucose as sole source of carbon and identification of some key enzymes of pyrene biodegradation pathway. *Journal of Proteomics*. 2017, Vol. 167, págs. 25-35.
82. Tribelli PM, Rossi L., Ricardi MM. Microaerophilic alkane degradation in *Pseudomonas extremaustralis*: a transcriptomic and physiological approach. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2017, Vol. 45, págs. 15-23.
83. Zucoloto B, Rodrigues VD, de Oliveira VM, Mariscal LM and Marsaiolia AJ. Enzymatic potential of heterotrophic bacteria from a neutral copper mine drainage. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016, Vol. 47, págs. 846-852.
84. Medina JDC, Woiciechowski AL, Guimarães LRC, Karp SG and Soccol CR. 10 - Peroxidases. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. 2017, págs. 217-232.

85. Chang YC, Choib D, Takamizawa K and Kikuchia S. Isolation of *Bacillus* sp. strains capable of decomposing alkali lignin and their application in combination with lactic acid bacteria for enhancing cellulase performance. *Bioresource Technology*. 2014, Vol. 152, págs. 429-436.
86. D, Borrelli GM and Trono. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, Vol. 16.
87. Araujo FA, Barh D, Silva A, Guimarães L and Ramos RTJ. GO FEAT: a rapid web-based functional annotation tool for genomic and transcriptomic data. *Scientific Reports*. 2018, Vol. 8.
88. Chen C, Huang H and Wu CH3. Protein Bioinformatics Databases and Resources. *Methods in Molecular Biology*. 2017, Vol. 1558.
89. Finn RD, Attwood TK, Babbitt PC , Bateman A , Bork P and et al. InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Research*. 2017, Vol. 45.
90. Geer LY, Domrachev M , Lipman DJ , Bryant SH . CDART: protein homology by domain architecture. *Genome Research*. 2002, Vol. 10.
91. Letunic I, Doerks T , Bork P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*. 2012, Vol. 40.
92. Cai CZ, Han LY, Ji ZL , Chen X , Chen YZ . SVM-Prot: Web-based support vector machine software for functional classification of a protein from its primary sequence. *Nucleic Acids Research*. 2003, Vol. 31.
93. Peabody MA, Laird MR, Vlasschaert C , Lo R, Brinkman FS. PSORTdb: expanding the bacteria and archaea protein subcellular localization database to better reflect diversity in cell envelope structures. *Nucleic Acids Research*. 2016, Vol. 44.
94. Yu CS, Chen YC , Lu CH , Hwang JK . Prediction of protein subcellular localization. *Proteins*. 2006, Vol. 64.
95. Lee H-L, Chiang C, Liang S-Y, Lee D-Y. Quantitative Proteomics Analysis Reveals the Min System of *Escherichia coli* Modulates Reversible Protein Association with the Inner Membrane. *Molecular and cellular proteomics*. 2016, Vol. 15.
96. Gasteiger E, Gattiker A , Hoogland C , Ivanyi I , Appel RD , Bairoch A . ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*. 2003, Vol. 31.
97. Kathera C, Dulla EL, Chinahadri VP ,Mallakuntla TS , Basavaraju S , and Jasti P. Proteomic characterization and bio-informatic analysis of differentially expressed *E. coli* Nissle 1917 proteins with response to cocoti wine stress. *3 Biotech*. 2017, Vol. 7.
98. Franceschini A, Szklarczyk D , Frankild S , Kuhn M , Simonovic M , Roth A , Lin J , Minguéz P , Bork P , von Mering C , Jensen LJ . STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Research*. 2013, Vol. 41.
99. Camacho C, Coulouris G , Avagyan V , Ma N , Papadopoulos J , Bealer K , Madden TL. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009, Vol. 10.
100. Folador EL, de Carvalho PV, Silva WM, Ferreira RS, Silva A, Gromiha M, Ghosh P, Barh D, Azevedo V, Röttger R. In silico identification of essential proteins in *Corynebacterium pseudotuberculosis* based on protein-protein interaction networks. *BMC Systems Biology*. 2016, Vol. 10.

101. Shahbaaz M, ImtaiyazHassan MD, and Ahmad F. Functional Annotation of Conserved Hypothetical Proteins from Haemophilus influenzae Rd KW20. *PLoS One*. 2013, Vol. 8.
102. McClure R1, Balasubramanian D, Sun Y, Bobrovskyy M, Sumbly P, Genco CA, Vanderpool CK and Tjaden B. Computational analysis of bacterial RNA-Seq data. *Nucleic Acids Research*. 2013, Vol. 41.
103. Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*. 2005, Vol. 21.
104. Parween T, Bhandari P, Sharma R, Jan S et al. Bioremediation: A Sustainable Tool to Prevent Pesticide Pollution. *Modern Age Environmental Problems and their*. 2017, Vol. 1.
105. Pollegioni L, Schonbrunn E, and Siehl D. Molecular basis of glyphosate resistance: Different approaches through protein engineering. *The FEBS Journal* . 2012, Vol. 278.
106. Sviridov AV, Shushkova TV, Ermakova IT, Ivanova EV, and Leontievsky AA. Glyphosate: Safety Risks, Biodegradation,2 and Bioremediation. *Dust Removal and Collection Techniques in "Current Environmental Issues and Challenges"*. 2014, Vol. 1.
107. Moneke AN, Okpala GN and Anyanw CU. Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields. *African Journal of Biotechnology*. 2010, Vol. 9.
108. Martinez P, Bernal J, Agudelo E y Bernier S. TOLERANCIA Y DEGRADACION DEL GLIFOSATO POR BACTERIAS AISLADAS DE SUELOS CON APLICACIONES FRECUENTES DE ROUNDUP SL®. *Revista Pilquen*. 2012, Vol. 14.
109. Fan J, Yang G, Zhao H, Shi G, Geng Y, Hou T, Tao K. Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. *The journal of general and applied microbiology*. 2012, Vol. 58.
110. Sviridov AV, Shushkova TV, Ermakova IT, Ivanova EV, Epiktetov DO, Leont'evskii AA. [Microbial degradation of glyphosate herbicides (review)]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*. 2015, Vol. 51.
111. Zhan T, Zhang K, Chen Y, Lin Y, Wu G, Zhang L, Yao P, Shao Z, and Liu Z. Improving Glyphosate Oxidation Activity of Glycine Oxidase from *Bacillus cereus* by Directed Evolution. *PLoS ONE*. 2013, Vol. 8.
112. Iyer R, Iken B, Damania A, y Krieger J. Whole genome analysis of six organophosphate-degrading rhizobacteria reveals putative agrochemical degradation enzymes with broad substrate specificity. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018, Vol. 25, págs. 13660-13675.
113. Shu X, Wang Y, Zhou Q, Li M, Hu H,1, Ma Y, and et al. Biological Degradation of Aflatoxin B1 by Cell-Free Extracts of *Bacillus velezensis* DY3108 with Broad PH Stability and Excellent Thermostability. *Toxins* . Vol. 10.
114. der, Zhang Q and van. Answers to the Carbon–Phosphorus Lyase Conundrum. *Chembiochem*. 2012, Vol. 13.
115. GM, Gebhardy S and Cook. Differential Regulation of High-Affinity Phosphate Transport Systems of *Mycobacterium smegmatis*: Identification of PhnF, a Repressor of the phnDCE Opero. *Journal of Bacteriology*. 2008, Vol. 190.
116. Jochimsen B, Lolle S, McSorley FR, Nabi M, Stougaard J, Zechel LD and Hove-Jensen B. Five phosphonate operon gene products as components of a multi-subunit

- complex of the carbon-phosphorus lyase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011, Vol. 108.
117. WW, White AK and Metcalf. Two C-P lyase operons in *Pseudomonas stutzeri* and their roles in the oxidation of phosphonates, phosphite, and hypophosphite. *Jurnal Bacteriology*. 2004, Vol. 186.
118. Illingworth M, Ellis H, and Chen L. Creating the Functional Single-Ring GroEL-GroES Chaperonin Systems via Modulating GroEL-GroES Interaction. *Scientific Reports*. 2017, Vol. 7.
119. Ghai I, Bajaj H, Bafna JA, Hussein HAED, Winterhalter M, and Wagner R. Ampicillin permeation across OmpF, the major outer-membrane channel in *Escherichia coli*. *Jurnal Biological Chemistry*. 2018, Vol. 293.
120. M, Chopra I and Roberts. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001, Vol. 65.
121. B, Ziervogel BK and Roux. The Binding of Antibiotics in OmpF Porin. *Structure* . 2014, Vol. 21.
122. Liu J, Wang M, Yi H, Liu M, Zhu D, Wu Y, Jia R, Sun K, Yang Q, Chen S, Zhao X, Chen X, Cheng A. ATPase activity of GroEL is dependent on GroES and it is response for environmental stress in *Riemerella anatipestifer*. *Microbial Pathogenesis*. 2018, Vol. 121.
123. Tribelli PM, Di Martino C, López NI and Raiger lustman LJ. Biofilm lifestyle enhances diesel bioremediation and biosurfactant production in the Antarctic polyhydroxyalkanoate producer *Pseudomonas extremaustralis*. *Biodegradation*. 2012, Vol. 23, págs. 645-651.
124. Raiger lustman, L.J., Tribelli, P.M., Ibarra, J.G. et al. Genome sequence analysis of *Pseudomonas extremaustralis* provides new insights into environmental adaptability and extreme conditions resistance. *Extremophiles*. 2015, Vol. 19, págs. 207-220.
125. Dzionek A, Wojcieszynska D and Guzik U. Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2016, Vol. 23, págs. 28-36.
126. Benforte FC, Colonnella MA, Ricardi MM, Solar Venero EC, Lizarraga L, López NI, Tribelli PM. Novel role of the LPS core glycosyltransferase WapH for cold adaptation in the Antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *PLoS One*. 2018.
127. Z, Cycoń M and Piotrowska. Pyrethroid-Degrading Microorganisms and Their Potential for the Bioremediation of Contaminated Soils: A Review. *Front Microbiol*. 2016.
128. Vásquez F, Llantén SH, Pavlov MS, Marshall SH y Pacheco JP. Phylogenetic MLSA and phenotypic analysis identification of three probable novel *Pseudomonas* species isolated on King George Island, South Shetland, Antarctica. *Brazilian journal of microbiology*. 15 de marzo de 2018.
129. Jensen BH, Zechel DL and Jochimsena B. Utilization of Glyphosate as Phosphate Source: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014, Vol. 78.
130. Wang Y, Ezemaduka AN, Li Z, Chen Z, Canción C. Joint Toxicity of Arsenic, Copper and Glyphosate on Behavior, Reproduction and Heat Shock Protein Response in *Caenorhabditis elegans*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2017, Vol. 98, págs. 465–471.

131. Huang Y, Xiao L, Li F, Xiao M, Lin D, Long X, and Wu Z. Microbial Degradation of Pesticide Residues and an Emphasis on the Degradation of Cypermethrin and 3-phenoxy Benzoic Acid: A Review. *Molecules*. 2018, Vol. 23.
132. Rousidou K, Chanika E , Georgiadou D, Soueref E , Katsarou D et al. Isolation of Oxamyl-degrading Bacteria and Identification of cehA as a Novel Oxamyl Hydrolase Gene. *Front Microbiol*. 2016.
133. Arora, Pankaj Kumar. Decolourization of 4-Chloro-2-Nitrophenol by a Soil Bacterium, *Bacillus subtilis* RKJ 700. *PLoS One*. 2012, Vol. 7.
134. Eswar N, Webb B, Marti-Renom ,Madhusudhan MS,Eramian D. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2014, Vol. 5.
135. Chacón MG, Kendrick EG y Leak DJ. Engineering *Escherichia coli* for the production of butyl octanoate from endogenous octanoyl-CoA. *PeerJ*. 2019, Vol. 7.
136. Pollegioni L, Schonbrunn E, and Siehl D. Molecular basis of glyphosate resistance: Different approaches through protein engineering. *The FEBS Journal* . 2011, Vol. 278.
137. AF, Méndez. Aislamiento e identificación de bacterias capaces de degradar glifosato. *Universidad ICESI*. 2015.
138. Seydlová G, Halada P , Fišer R , Toman O , Ulrych A , Svobodová J. DnaK and GroEL chaperones are recruited to the *Bacillus subtilis* membrane after short-term ethanol stress. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, Vol. 112.