

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Análisis del transcriptoma y proteoma de la cepa *Burkholderia zhejiangensis*  
CEIB S4-3 en el proceso de biodegradación del plaguicida paratión metílico

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS NATURALES**

PRESENTA:

**M. EN B. MARÍA LUISA CASTREJÓN GODÍNEZ**

DIRECTORA:

**DRA. MA. LAURA ORTIZ HERNÁNDEZ**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**FEBRERO, 2019**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM); y en el Laboratorio de Proteómica del Centro de Ciencias Genómicas (CCG) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

La presente tesis se realizó en el marco del proyecto del **“TRANSCRIPTOMA Y PROTEOMA DE DOS CEPAS DE *Burkholderia* sp. EN EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS”** apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), fondo Ciencia Básica, con clave de proyecto **CB2014-240414**.

**Dedicada con cariño:**

**A mis padres, Jesús y German,  
por el inmenso amor, enseñanzas y  
apoyo en todo momento.**

**A mi esposo Alexis y a mis  
dos hijos Matías y Alexa  
ustedes son mi motivación.**

**Los amo**

## **A**GRADECIMIENTOS

A mi hermano **Francisco Castrejón Godínez** y su esposa **Gloria Xóchitl Cruz Mejía** por el cariño y apoyo.

A mi directora de tesis la **Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández**, con una profunda admiración y gratitud, le agradezco por la confianza, el apoyo incondicional, su amistad, su tiempo y por transmitir sus conocimientos ambientales.

Un agradecimiento especial al **Dr. Sergio Encarnación Guevara** el cual me abrió las puertas de su laboratorio para realizar los análisis proteómicos, gracias doctor por su apoyo.

Al **M. en C. Enrique Sánchez Salinas** por sus enseñanzas, su apoyo, conocimiento transmitido y su amistad.

A los miembros del comité tutorial, por su presencia y aportación para mi desarrollo profesional, muchas gracias a cada uno: **Dr. Armando Hernández Mendoza, Dr. Edgar Dantán González, Dr. Jorge Luis Folch Mallol y Dr. Sergio Encarnación Guevara.**

A los profesores que formaron parte de los comités de evaluación, **Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa, Dr. Efraín Tovar Sánchez, Dr. Gerardo Corzo Burguete, Dr. José Augusto Ramírez Trujillo, Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani y Dra. Susana Valencia Díaz** por sus aportaciones al trabajo.

Al **Biol. Gabriel Martínez Batallar** un agradecimiento con mucho cariño y admiración por su apoyo en los experimentos de proteómica y su amistad.

A la **M. en C. Magdalena Hernández Ortiz** por el apoyo en la identificación de proteínas.

Al **Biol. Jasiel Quintero García** por el acompañamiento y apoyo en las cinéticas de crecimiento.

A la **Biol. Yitzel Gama Martínez** por el tiempo compartido en el laboratorio y su apoyo en los análisis transcriptómicos.

Al **Dr. Emmanuel Salazar Bustamante** por su apoyo en los análisis transcriptómicos.

A la **Dra. Patricia Mussali Galante** por las sugerencias al trabajo.

A la **M. en B. Ana Karen Ivanna Flores Trujillo**, por su amistad y apoyo incondicional en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales.

A todos mis compañeros del **Laboratorio de Investigaciones Ambientales** del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), y a mis compañeros del **Laboratorio de Marcadores Moleculares** del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC), quiero agradecer a **Marcos Rosas, Uriel Valladares, Victoria Medina, Cynthia Concepción, Damaris Santana, Dra. Isela Hernández, Dra. Lety Valencia, Juan Ramirez, Miguel Santoyo, Miguel Galvan, Elgar Castillo, Carlos Vergara, Anahid Fuentes, Carlos Quintana, Dalia Muro, Dania Rebolledo, Joel Castañeda, Aarón Chavez y Miriam Serrano** por sus aportaciones en los seminarios de grupo.

A mis amigas, **Eunice Diaz, Karla Gonzalez y Cristina Monsalvo**, gracias todos los momentos compartidos, por su amistad y el cariño.

A mis amigos del Programa de Gestión Ambiental Universitario (PROGAU) **Julio Lara, Mariana Romero, Beny Macedo, Tania Popoca y Jazmín Moreno**, gracias a cada uno por su amistad, los consejos, por los momentos alegres y el tiempo compartido.

A todas las personas que de manera directa e indirecta colaboraron en la realización de ésta tesis.

**A TODOS ¡GRACIAS!**

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
ANTECEDENTES .....	9
JUSTIFICACIÓN.....	11
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVO GENERAL.....	13
LITERATURA CONSULTADA .....	13
CAPÍTULO I. DEGRADACIÓN DEL PARATIÓN METÍLICO POR LA CEPA <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3.....	18
1.1. INTRODUCCIÓN.....	18
1.2. DEGRADACIÓN DEL PARATIÓN METÍLICO.....	19
1.3. OBJETIVO .....	22
1.4. METODOLOGÍA .....	23
1.4.1. Plaguicida paratión metílico.....	23
1.4.2. Preparación del pre inóculo .....	23
1.4.3. Cultivo de la bacteria <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3 en presencia del plaguicida paratión metílico.....	23
1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
1.5.1. Cinéticas de crecimiento de la cepa <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3.....	25
1.6. CONCLUSIONES .....	30
1.7. LITERATURA CONSULTADA.....	30
CAPÍTULO II. ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS TRANSCRIPCIONALES DE cepa <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3 DURANTE LA DEGRADACIÓN DEL PARATIÓN METÍLICO.....	34
2.1. INTRODUCCIÓN.....	34
2.2. OBJETIVO .....	36
2.3. METODOLOGÍA .....	36
2.3.1. Extracción de RNA.....	37
2.3.2. Análisis y mapeo de los datos del RNA-seq.....	37
2.3.3. Conjunto de Grupos de Ortólogos de Proteínas (COGs).....	38
2.3.4. Análisis de la anotación funcional de los genes .....	39
2.3.5. RT-PCR del gen <i>mpd</i> y <i>pnpC</i> .....	39

2.3.6.	qRT-PCR del gen <i>mpd</i> y de los genes <i>pnpABA'E1E2FDC</i> .....	39
2.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
2.4.1.	Concentración de RNA de la cepa <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3 .....	41
2.4.2.	Limpieza de muestras de RNA con DNAsa .....	45
2.4.3.	RT-PCR del gen <i>mpd</i> y <i>pnpC</i> .....	48
2.4.4.	Secuenciación por Illumina HiSeq.....	51
2.4.5.	Contenido de GC de <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3.....	52
2.4.6.	Mapeo de las secuencias de <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3.....	52
2.4.7.	Expresión diferencial de genes de la cepa <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3 .....	54
2.4.8.	Anotación funcional por COG's .....	59
2.4.9.	Anotación funcional por Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).....	66
2.4.10.	Análisis del gen <i>mpd</i> involucrado en la hidrólisis de PM .....	73
2.4.11.	Análisis de los clusters <i>pnpABA'E1E2FDC</i> y <i>pnpE1E2FDC</i> involucrado en la degradación de PNF.....	75
2.4.12.	Validación del gen <i>mpd</i> y del cluster <i>pnpABA'E1E2FDC</i> por qRT-PCR.....	78
2.5.	CONCLUSIONES .....	83
2.6.	LITERATURA CONSULTADA.....	84
CAPÍTULO III. ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3 DURANTE LA DEGRADACIÓN DEL PARATIÓN METÁLICO .....		89
3.1.	INTRODUCCIÓN.....	89
3.2.	OBJETIVO .....	91
3.3.	METODOLOGÍA .....	91
3.3.1.	Extracción de proteínas.....	92
3.3.2.	Electroforesis en geles de primera y segunda dimensión .....	93
3.3.3.	Digitalización y análisis de los geles de segunda dimensión .....	94
3.3.4.	Identificación de proteínas por espectrofotometría de masas MALDI-TOF.....	94
3.3.5.	Conjunto de Grupos de Ortólogos de Proteínas (COGs) .....	96
3.3.6.	Análisis de la anotación funcional de los genes .....	96
3.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	97
3.4.1.	Concentración de proteínas .....	97
3.4.2.	Electroforesis en geles de dos dimensiones .....	97
3.4.3.	Análisis de los geles bidimensionales en PDQuest .....	99

3.4.4.	Análisis de la expresión diferencial de proteínas .....	100
3.4.5.	Identificación de proteínas por espectrometría de masas .....	108
3.4.6.	Anotación funcional por COG´s .....	116
3.4.7.	Análisis de la función de las proteínas utilizando Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) .....	124
3.5.	CONCLUSIONES .....	130
3.6.	LITERATURA CONSULTADA.....	131
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS GLOBAL DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES Y DE PROTEÍNAS DE <i>Burkholderia zhejiangensis</i> CEIB S4-3 DURANTE LA DEGRADACIÓN DEL PARATIÓN METÁLICO.....		136
4.1.	INTRODUCCIÓN.....	136
4.2.	OBJETIVO .....	136
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	137
4.3.1.	Anotación funcional por COG´s .....	137
4.3.2.	Análisis de la función de las proteínas utilizando Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway Color.....	145
4.4.	CONCLUSIONES .....	156
4.5.	LITERATURA CONSULTADA.....	156
ANEXOS .....		161

## RESUMEN

Los plaguicidas constituyen una herramienta importante para el desarrollo de la agricultura y su uso ha contribuido a incrementar la producción de alimentos y de materias primas. Sin embargo, la aplicación de plaguicidas puede causar efectos adversos a las diferentes formas de vida y a los ecosistemas, lo cual hace necesario desarrollar tecnologías para garantizar su eliminación de manera eficiente. Entre éstas, se encuentra la remediación biológica por microorganismos, donde las enzimas median la degradación de los contaminantes. Los estudios de biorremediación de plaguicidas se centraban en la caracterización de cepas bacterianas capaces de degradar estos compuestos, actualmente con herramientas como las omicas han permitido analizar la expresión de genes (Transcriptoma) e identificar proteínas (Proteómica) que este involucrados en la degradación de compuestos xenobióticos.

En el Laboratorio de Investigaciones Ambientales del Centro de Investigación en Biotecnología, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), en el año 2012 Popoca-Ursino aisló la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 de muestras de suelo del municipio de Tepoztlán, Morelos. La cepa tiene la capacidad de hidrolizar al plaguicida organofosforado paratión metílico (PM) en tres horas a una concentración de 50 mg/L y degrada completamente al principal metabolito de si hidrólisis *p*-nitrofenol (PNF) en 15 horas, utilizándolo como fuente de carbono. Este trabajo tuvo como objetivo analizar los cambios transcripcionales y traduccionales de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en presencia y ausencia de paratión metílico.

En este trabajo, a través de un enfoque transcriptómico y proteómico, se evaluaron los cambios en la expresión génica y de proteínas durante la hidrólisis PM y la degradación del PNF por *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3, los cuales revelaron cambios diferenciales en la expresión de genes y de proteínas. Los datos transcriptómicos mostraron la sobreexpresión de ocho genes en el tiempo de cero horas, 376 en el tiempo de tres horas y 756 genes en el tiempo de nueve horas en la condición con PM. Por otro lado, en la condición sin PM se obtuvieron cero genes en el

tiempo de cero horas, 278 genes en el tiempo de tres horas y 823 en el tiempo de nueve horas. Además, los genes catabólicos PNF (*pnpABA'E1E2FDC* y *pnpE1E2FDC*) se mostraron sobreexpresados en presencia del PM presentes en *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3. Estos clusters de genes se validaron mediante qRT-PCR la expresión del gen *mpd*, así como los genes responsables de la degradación de PNF contenidos en los dos grupos, lo que demuestra las rutas de degradación de PNF por la cepa probada en este trabajo. La exposición a PNF activa, en primer lugar, la expresión de los reguladores transcripcionales MarR, e IcIR, que son importantes en la regulación de genes del catabolismo de compuestos aromáticos, así como la expresión de genes que codifican transportadores, permeasas, bombas de eflujo y porinas relacionadas con la resistencia a múltiples fármacos y otros xenobióticos.

Por otro lado, en el análisis proteómico se identificaron proteínas en la condición con PM, como *peroxirredoxinas*, las cuales juegan un papel como enzimas antioxidantes, las cuales pueden estar ayudando contra el daño oxidativo a la bacteria. Además de NAD (+) cinasas las cuales pueden estar neutralizando especies reactivas de oxígeno. Se demostró que la bacteria es capaz de degradar el PNF por las dos rutas reportadas, debido a que se identificó la proteína *Hidroquinona 1,2 dioxigenasa* la cual está implicada en la ruta de degradación de PNF de las Gram positivas y la proteína *Hidroxiquinol 1,2 dioxigenasa* implicada en la ruta de degradación de PNF en Gram negativas, y las vías metabólicas como la de la degradación de benzoato y el metabolismo de glioxilato y dicarboxilato presentes en la condición con PM, fortalecen el modelo de degradación de la cepa debido a que utilizan el plaguicida como fuente de carbono.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Los plaguicidas se utilizan en el mundo para el control de diferentes plagas. Sin embargo, sus aplicaciones han causado efectos adversos en todos los niveles de organización biológica, desde las moléculas hasta los ecosistemas, lo que dependerá del grado de sensibilidad de los organismos y del tipo de plaguicidas empleados (Eden *et al.*, 2016; Mailly *et al.*, 2017).

### Definición de plaguicida

De acuerdo con el Código Internacional de Conducta Sobre la Distribución y Uso de Plaguicidas de la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas, se establece que un plaguicida es *cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos* (FAO, 2006; Schaaf, 2013).

### Importancia de los plaguicidas

Los plaguicidas constituyen una herramienta importante en el desarrollo de la agricultura y su uso ha contribuido a incrementar la producción de alimentos y materias primas, a pesar de los esfuerzos realizados para encontrar métodos no químicos para el manejo de las plagas y vectores para enfermedades como la malaria, la fiebre amarilla, entre otras, estos siguen siendo muy utilizados a nivel mundial. Además, la producción y uso de los plaguicidas presentan una fuente de trabajo para un gran número de personas, no solamente en el sector agrícola, sino en la industria química (Bonilla *et al.*, 2000; Damalas, 2009; Grovermann *et al.*, 2017).

## Clasificación de plaguicidas

Los plaguicidas se clasifican en función de varias características. A continuación, se presentan las más comunes (Eden *et al.*, 2016):

### De acuerdo con su concentración:

- **Plaguicida técnico:** la máxima concentración del ingrediente activo obtenida como resultado final de su síntesis, y es utilizado exclusivamente como materia prima en la formulación de plaguicidas.
- **Plaguicida formulado:** mezcla de uno o más plaguicidas técnicos, con uno o más ingredientes conocidos como inertes o diluyentes, cuyo objeto es dar estabilidad al ingrediente activo o hacerlo útil y eficaz; constituye la forma usual de aplicación de los plaguicidas.

### Por el organismo que controlan

Se clasifican en: Insecticida, Acaricida, Fungicida, Bactericida, Herbicida, Rodenticida y Molusquicida.

### De acuerdo con su composición química

Los plaguicidas se clasifican de acuerdo a su composición química, en la tabla 1 se muestran los principales grupos.

**Tabla 1.** Clasificación de los principales grupos de plaguicidas según su composición química (Ramírez y Lacasaña, 2001; Ortiz-Hernández *et al.*, 2013a).

Compuesto	Composición
<b>Organoclorados</b>	Átomos de carbono, cloro, hidrógeno y en ocasiones oxígeno.
<b>Organofosforados</b>	Poseen un átomo central de fósforo en la molécula. Son más tóxicos y menos estables en el ambiente, en relación con los organoclorados.
<b>Carbamatos</b>	Estructura química basada en una planta alcaloide <i>Physostigma venenosum</i> .
<b>Piretroides</b>	Compuestos sintéticos similares a las piretrinas (alcaloides obtenidos de los pétalos de <i>Chrysanthemum cinerariifolium</i> ).
<b>De origen botánico</b>	Productos botánicos directamente de plantas, que no se sintetizan químicamente.
<b>De cobre</b>	Compuestos inorgánicos de cobre.
<b>Tiocarbamatos</b>	Difieren de los carbamatos en su estructura molecular en que contienen un grupo -S- en su composición.
<b>Organoestánicos</b>	Presencia de un estaño como átomo central de la molécula.
<b>Organoazufrados</b>	Poseen un azufre como átomo central en su molécula.
<b>Dinitrofenoles</b>	Se reconocen por la presencia de dos grupos nitro (-NO <sub>2</sub> ) unidos a un anillo fenólico.
<b>Derivados de la urea</b>	Compuestos que incluyen a la urea unida a compuestos aromáticos.
<b>Composición diversa</b>	Triazinas, flalimidias, carboxiamidas, derivados de los ácidos tricloroacéticos y tricloropicolínico, guanidinas y nafloquinonas, biperidílicos.

## Plaguicidas organofosforados

Los compuestos organofosforados son ésteres del ácido fosfórico y de sus derivados (Fernández *et al.*, 2010). El Bladan o Tetraetilpirofosfato (TEPP) fue uno de los primeros plaguicidas organofosforados sintetizado y se usó como insecticida y rodenticida en Alemania (Pose *et al.*, 2000). El desarrollo de estos plaguicidas se atribuye a Gerhard Schrader a comienzos de 1930. Posteriormente sintetizó otro compuesto denominado Schradan (insecticida sistémico), el cual fue usado varios años y fue descartado por ser altamente tóxico. En los años 1936 y 1944, se sintetizaron varios ésteres organofosforados como el Sarin, Tabún y Sóman, gases extremadamente tóxicos en humanos y considerados como armas de guerra. Su producción y almacenamiento fueron prohibidos por la Convención de Armas Químicas en 1993. Posteriormente se sintetizaron derivados menos volátiles y menos peligrosos, como el paratión.

Los plaguicidas organofosforados han sido utilizados para controlar una gran variedad de plagas alrededor del mundo (Chino-Flores, 2011), son menos tóxicos y tienen menor capacidad para acumularse en los tejidos con respecto a los plaguicidas organoclorados (Ortíz *et al.*, 2014). Además, estos plaguicidas inhiben la enzima acetilcolinesterasa, resultando en la acumulación del neurotransmisor acetilcolina en la sinapsis. Esta inhibición causa convulsiones, parálisis y finalmente la muerte para insectos y mamíferos (Van Dyk y Pletschke, 2011).

## Uso de los plaguicidas organofosforados

El uso proporcionado a los plaguicidas ha sido múltiple, por ejemplo, la agricultura es la actividad donde más se emplean este tipo de compuestos, consumiendo el 85% de la producción mundial, con la finalidad de controlar plagas, las cuales disminuyen la cantidad y calidad de las cosechas. Además, se utiliza un 10% de la producción total de plaguicidas en actividades de salud pública, para el control de vectores para enfermedades como la malaria (*Anopheles* sp.), Chagas (*Triatoma infestans*) y el dengue (*Aedes aegypti*).

Los plaguicidas también son utilizados en la industria excesivamente en la fabricación de equipos eléctricos, pinturas, papel, cartón y materiales para embalaje de alimentos. Además, son utilizados en la ganadería y para el cuidado de animales domésticos. Otro sector donde son sumamente empleados es en el hogar, en donde son aplicados dentro o fuera de la casa para el control de insectos. Asimismo, son incorporados en productos como cosméticos, champús, jabones y repelentes de insectos (Ramírez y Lacasaña, 2001).

## **Efectos de los plaguicidas organofosforados sobre la salud humana y el ambiente**

Los plaguicidas organofosforados pueden ingresar al organismo por inhalación, ingestión o vía cutánea, ocasionando reacciones alérgicas como vómito, cefalea, conjuntivitis, calambres abdominales, disnea, tos, entre otros. Además estos plaguicidas presentan un modo de acción tóxico específico que tiene lugar a nivel sináptico, en donde al unirse en forma covalente con la enzima acetilcolinesterasa (AChE, por sus siglas en inglés) en las terminaciones nerviosas inhiben su actividad enzimática normal de hidrólisis de la acetilcolina en colina y acetato, lo que da como resultado la acumulación excesiva de este neurotransmisor y en consecuencia pérdida de la coordinación muscular, convulsiones y finalmente la muerte (Badii y Varela, 2008).

De acuerdo con la OMS, anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a plaguicidas. Las tres cuartas partes de los afectados pertenecen a los países subdesarrollados, donde únicamente se utiliza el 25% de la producción mundial de plaguicidas. A nivel mundial, se estima que el 3% de los trabajadores rurales se intoxican con plaguicidas de uso agrícola cada año (Fernández *et al.*, 2012).

El uso de plaguicidas puede también causar efectos adversos sobre las diferentes formas de vida y sobre los ecosistemas. Esto dependerá del grado de sensibilidad de los organismos en cuestión y del tipo de plaguicida empleado (Eden *et al.*, 2016). El uso de plaguicidas para controlar las plagas y proteger los cultivos ha sido asociado ampliamente con la contaminación de agua, suelo, aire y alimentos. Los plaguicidas que se aplican en la agricultura representan una fuente

importante de contaminación, que no solo impacta en los suelos, sino que, al ser dispersados por el viento, pueden llegar a cuerpos de agua afectando a las especies asociadas (Tomita y Beyruth, 2002). Otra potencial fuente de contaminación por plaguicidas son los almacenamientos de productos caducos y obsoletos que se disponen sin ningún control y generalmente expuestos al ambiente (Martínez *et al.*, 2005). Los informes de la Organización de las Naciones Unidas estiman que, de todos los plaguicidas usados en la agricultura, menos del 1% alcanza los cultivos y el resto termina contaminando el suelo, el aire y principalmente, el agua (Gamon *et al.*, 2003; Shalaby y Abdou, 2010).

## **Métodos de transformación de los plaguicidas**

Los daños que causan al ambiente y a la salud, así como la existencia de plaguicidas obsoletos, hacen necesario el desarrollo de tecnologías que garanticen su eliminación de una manera segura, eficiente y de bajo costo. Diferentes métodos de transformación han sido utilizados para eliminar residuos de plaguicidas, así como plaguicidas caducos u obsoletos, algunos de los cuales se describen a continuación:

### **Métodos fisicoquímicos**

Los métodos fisicoquímicos más utilizados son la incineración a altas temperaturas, la hidrólisis alcalina o ácida y la filtración a través de carbón activado. Un método puede ser aplicado efectivamente para un grupo de plaguicidas, pero totalmente inadecuado para otro, por lo que es esencial revisar el método y el producto que se desea tratar.

La incineración es un proceso de oxidación térmica a altas temperaturas mediante el cual las moléculas del plaguicida se descomponen en gases y sólidos (cenizas). Por otro lado, a la hidrólisis alcalina se le añade hidróxido sódico o cal, utilizada para destruir plaguicidas organofosforados y carbamatos, reduciendo su actividad biológica. Sin embargo, el tratamiento químico presenta algunas limitaciones a pesar de que la hidrólisis puede afectar al ingrediente

activo, por lo general no influye en los disolventes orgánicos utilizados en la formulación, siendo necesario eliminar el disolvente. Otro de los problemas es que pueden dar origen a subproductos sumamente tóxicos y, además, generar un volumen mayor de residuos (FAO, 2010).

## Tratamientos biológicos

Los *tratamientos biológicos* prometen ser eficientes, más económicos y seguros, debido a que se llevan a cabo mediante diferentes tipos de reacciones catalizadas por enzimas de microorganismos específicos (Ortiz-Hernández *et al.*, 2013b). La importancia de los microorganismos, para la remediación, radica en su gran capacidad de adaptación, su diversidad metabólica y a la existencia de diversas enzimas microbianas, lo que les permite desarrollar capacidades para degradar xenobióticos cuando son expuestos a ellos (Singh y Walker, 2006; Ortiz-Hernández *et al.*, 2018).

Actualmente los microorganismos, especialmente las bacterias, han sido ampliamente estudiadas y utilizadas para la degradación de plaguicidas, debido a la diversidad metabólica que les permite utilizar a estos compuestos químicos como fuente de carbono y energía (Nojiri y Tsuda, 2005). Inicialmente los estudios de biorremediación de plaguicidas se enfocaban en el aislamiento, identificación y caracterización de cepas bacterianas o consorcios capaces de degradar estos compuestos, posteriormente se llevaron a cabo estudios de genómica ambiental, los cuales se enfocaron en la caracterización de cepas a través del marcador 16S RNAr y el establecimiento de propuestas para las vías de degradación de plaguicidas (Symons y Bruce 2006). Sin embargo, este conocimiento no es suficiente para predecir el comportamiento de los organismos durante el proceso de biodegradación.

Se han utilizado sistemas biológicos como los microorganismos para dar tratamiento a sitios contaminados con plaguicidas (Moens *et al.*, 2004). Estos compuestos químicos constituyen una adecuada fuente de carbono y pueden servir como donadores de electrones para ciertos microorganismos (Rodríguez, 2003).

Han sido reportados numerosos microorganismos con la capacidad de degradación de plaguicidas, siendo los géneros de *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus*, *Agrobacterium* y *Aspergillus* los más frecuentes. Estos microorganismos presentan enzimas involucradas en la hidrólisis de enlaces como P-O, P-F, P-S y P-C encontrados en una amplia variedad de plaguicidas organofosforados (Singh y Walker, 2006) y a su vez estas enzimas degradadoras están codificadas por distintos genes, como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Enzimas que degradan compuestos organofosforados (Modificado de Singh y Walker, 2006).

Enzima	Gen	Origen	PM (kD)	Estructura	Enlace			
					P-O	P-F	P-S	P-C
<b>BACTERIAS</b>								
OPH	<i>opd</i>	<i>Pseudomonas diminuta</i>	72	Dímero	+	+	+	+
MPH	<i>mpd</i>	<i>Plesiomonas</i> sp. M6	35	ND	ND	ND	ND	ND
OPAA	<i>opaA</i>	<i>Alteromonas</i> sp.	50-60	Monómero	+	+	-	+
OPDA	<i>opdA</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	70	Dímero	+	+	+	+
ADPasa	<i>adpB</i>	<i>Nocardia</i> sp.	43	Monómero	+	ND	ND	-
AMPP	<i>pepA</i>	<i>Escherichia coli</i>	52	Tetrámero	+	ND	ND	ND
HOCA	<i>hocA</i>	<i>Pseudomonas monteilli</i>	19	Monómero	+	ND	-	ND
PEH	<i>pehA</i>	<i>Burkholderia caryophilli</i>	58	Tetrámero	-	-	-	+
Fosfonatasa	<i>phn</i>	<i>Bacillus cereus</i>	37	Dímero	-	-	-	+
<b>HONGOS</b>								
A-OPH	<i>A-opd</i>	<i>Aspergillus niger</i>	67	Monómero	-	ND	+	ND
P-OPH	<i>P-opd</i>	<i>Penicillium lilacinum</i>	60	Monómero	+	ND	+	ND

PM = peso molecular, ND = no determinada, + = actividad positiva, - = actividad negativa. **OPH**= Hidrolasa de Organofosforados, **MPH**= Metil Paratión Hidrolasa, **OPAA**= Anhidrolasa Ácido de Organofosforados, **OPDA**= Agente Degradante de los Organofosforados, **AMPP**= Amino peptidasa P, **HOCA**= Hidrólisis de Coroxon, **PEH**= Hidrolasa de Éster de Fosfonato.

## ANTECEDENTES

En el Laboratorio de Investigaciones Ambientales del Centro de Investigación en Biotecnología, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), en el año 2012 Popoca-Ursino aisló la cepa S4-3 denominada *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 de muestras de suelo de cultivo de *Tagetes erecta* llamada comúnmente flor de cempaxúchitl del municipio de Tepoztlán, Morelos. La cepa tiene la capacidad de hidrolizar al plaguicida organofosforado paratión metílico (PM) con una actividad específica de 14.94  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, en tres horas a una concentración de 50 mg/L y degrada completamente al principal metabolito *p*-nitrofenol (PNF) en 15 horas, utilizándolo como fuente de carbono. Estas observaciones sugieren que este microorganismo presenta genes, que potencialmente generan enzimas con la capacidad de hidrolizar el PM y degradar el PNF (Hernández-Mendoza *et al.*, 2014). Actualmente se cuenta con el borrador (Draft) del genoma de la cepa, la cual tiene 154 contigs, una longitud de 7,666,843 bp. Además, los resultados sugieren que *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 presenta al menos dos cromosomas. Estos análisis han permitido identificar el gen de degradación de paratión metílico (*mpd*) con una identidad del 99% con el gen *MpdB* de *Burkholderia cepacia* caracterizada por Ekkhunnatham *et al.* (2012) y dos grupos de genes catabólicos de PNF similares a *pnpABA'E1E2FDC* y *pnpE1E2FDC*; identidades que van del 67 al 100% con proteínas *PnpABE1E2FDC* de *Burkholderia* sp. SJ98 (Vikram *et al.*, 2012; Vikram *et al.*, 2013). Estos genes catabólicos podrían explicar la capacidad de la bacteria para hidrolizar el PM y degradar completamente el PNF (Hernández-Mendoza *et al.*, 2014; Popoca-Ursino *et al.*, 2017).

Se ha reportado que las enzimas más comunes en la hidrólisis del plaguicida paratión metílico (PM) son las fosfotriesterasas, las cuales son aisladas de cepas bacterianas o de consorcios (Singh, 2009; Ortiz-Hernández *et al.*, 2011). La hidrólisis del PM genera dos compuestos intermediarios, el ácido dimetiltiofosfórico y el PNF (Munnecke y Hsieh, 1976; Martínez-Ocampo, 2015). Sin embargo, el PNF al irse liberando y aumentando su concentración presenta un efecto tóxico en las células bacterianas y en los sistemas biológicos, lo que ha llevado a su clasificación como un contaminante prioritario (Liu *et al.*, 2005). Sin embargo, muy pocos trabajos han reportado cepas

que hayan sido capaces de mineralizar completamente el plaguicida, como es el caso de *Pseudomonas* sp. A3 (Ramanathan y Lalithakumari, 1999; Liu *et al.*, 2005), el género *Ochrobactrum* (Qiu *et al.*, 2006) y *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 (Popoca-Ursino, 2012; Hernández-Mendoza *et al.*, 2014).

## JUSTIFICACIÓN

Si bien la información proporcionada por la genómica estructural es sumamente importante y aporta datos reveladores, no es suficiente para poder tener un análisis global de los procesos biológicos que estén involucrados en la degradación de plaguicidas y otros xenobióticos. Los métodos para secuenciación masiva del DNA han hecho posible conocer otros aspectos relacionados con el proceso de biodegradación, como es el caso de cambios transcripcionales bajo diferentes condiciones ambientales (transcriptoma) y la expresión diferenciada de proteínas cuando la bacteria está en contacto con los plaguicidas (proteómica). Particularmente la transcripción es de gran interés en la biología molecular y celular. La investigación en esta área es indispensable para descifrar los elementos funcionales del genoma y determinar cuándo los genes son expresados y de qué forma son regulados. El análisis de los cambios en la expresión de genes que acompaña a la exposición de las bacterias a los plaguicidas ayudará a comprender el proceso biológico de la cepa durante la degradación del plaguicida, a caracterizar los cambios en la transcripción de genes y a conocer los mecanismos moleculares involucrados en la degradación de los plaguicidas. Por otro lado, realizar el análisis de proteínas diferencialmente expresadas en respuesta a la presencia de plaguicidas es importante para entender qué tipo de proteínas están involucradas en la tolerancia a dichos plaguicidas o las que son responsables para la regulación del proceso de degradación de los mismos. El conocimiento de estos aspectos servirá de base para hacer más eficiente la eliminación de residuos de plaguicidas y la biorremediación de sitios contaminados, ya que *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 potencialmente puede ser utilizada en dichos procesos.

El presente proyecto surge con la finalidad de analizar los cambios transcripcionales y de la expresión diferenciada de proteínas cuando la bacteria *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 está en contacto y degrada el plaguicida organofosforado PM. El conocimiento de estos aspectos ayudará a comprender en mayor medida el proceso de degradación, lo que servirá de base para hacer más eficiente la eliminación de residuos de plaguicidas y la biorremediación de sitios

contaminados, lo que evidencia el potencial de esta cepa para que se convierta en una herramienta biotecnológica para estos procesos.

## HIPÓTESIS

La cepa de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3, con capacidad de degradar al paratión metílico, experimentará cambios transcripcionales y traduccionales en presencia o ausencia de este plaguicida. El conocimiento de estos cambios ayudará a comprender el proceso biológico de la cepa durante la degradación del plaguicida.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar los cambios transcripcionales y traduccionales de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en presencia y ausencia de paratión metílico.

## LITERATURA CONSULTADA

- Badii, M. H., & Varela S. (2008). Insecticidas organofosforados: Efectos sobre la salud y el ambiente. CULCYT. Toxicología de Insecticidas, 5(28), 5-17.
- Bonilla A. J. P., Peinado S. J. E., Urdaneta R. M. A., & Carrascal G. E. (2000). Reducción del escurrimiento de plaguicidas al mar Caribe. PNUMA. Bogotá, Colombia, 146 pp.
- Chino-Flores C. (2011). El papel del gen *opdE* de *Enterobacter* sp. en la degradación de plaguicidas organofosforados. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos. 96 pp.
- Damalas, C. A. (2009). Understanding benefits and risks of pesticide use. *Scientific Research and Essays*, 4(10), 945-949.
- Eden W. R. C. A., Gallága S. J. C., Conde M. P. C., & Rosales C. J. A. (2016). Catálogo de plaguicidas. COFEPRIS. pp. 49.
- Ekkhunnatham, A., Jongsareejit, B., Yamkunthong, W., & Wichitwechkarn, J. (2012). Purification and characterization of methyl parathion hydrolase from *Burkholderia cepacia*

- capable of degrading organophosphate insecticides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1739-1746.
- FAO. (2006). Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas, versión revisada. Roma, Italia. 35 pp.
- FAO. (2010). Código Internacional de Conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. <http://www.fao.org/docrep/006/Y4544S/y4544s02.htm#bm2.1>
- Fernández, A. D. G., Mancipe, G. L. C., & Fernández, A. D. C. (2010). Intoxicación por organofosforados. *Revista Médica*, 18(1), 84-92.
- Fernández, N., Pujol, E., & Maher, E. (2012). Los plaguicidas aquí y ahora. Primera edición, Ministerio de Educación de la Nación. Buenos Aires, Argentina. 124 pp.
- Gamón, M., Sáez, E., Gil, J., & Boluda, R. (2003). Direct and indirect exogenous contamination by pesticides of rice-farming soils in a Mediterranean wetland. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44(2), 0141-0151.
- Grovermann, C., Schreinemachers, P., Riwthong, S., & Berger, T. (2017). 'Smart' policies to reduce pesticide use and avoid income trade-offs: An agent-based model applied to Thai agriculture. *Ecological Economics*, 132, 91-103.
- Hernández-Mendoza, A., Martínez-Ocampo, F., Beltrán, L. F. L. A., Popoca-Ursino, E. C., Ortiz-Hernández, L., Sánchez-Salinas, E., & Dantán-González, E. (2014). Draft genome sequence of the organophosphorus compound-degrading *Burkholderia zhejiangensis* strain CEIB S4-3. *Genome Announcements*, 2(6), e01323-14.
- Liu, H., Zhang, J. J., Wang, S. J., Zhang, X. E., & Zhou, N. Y. (2005). Plasmid-borne catabolism of methyl parathion and p-nitrophenol in *Pseudomonas* sp. strain WBC-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(4), 1107-1114.
- Maily, F., Hossard, L., Barbier, J. M., Thiollet-Scholtus, M., & Gary, C. (2017). Quantifying the impact of crop protection practices on pesticide use in wine-growing systems. *European Journal of Agronomy*, 84, 23-34.
- Martínez, J., Mallo, M., Lucas, R., Álvarez, J., Salvarrey, A., & Gristo, P. (2005). Guía para la Gestión Integral de Residuos Peligrosos. Fichas Temáticas. Centro Coordinador del Convenio de Basilea para América Latina y el Caribe. Montevideo.
- Martínez-Ocampo, F. (2015). Ensamblaje del genoma de *Burkholderia* sp. y análisis de la anotación funcional de genes involucrados en la degradación de compuestos organofosforados. Tesis de Maestría en Biotecnología. Centro de Investigación en

- Biotecnología (CEIB), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Cuernavaca, Morelos, México.
- Moens, T., Araya, M., Swennen, R., & De Waele, D. (2004). Enhanced biodegradation of nematicides after repetitive applications and its effect on root and yield parameters in commercial banana plantations. *Biology and Fertility of Soils*, 39(6), 407-414.
- Munnecke, D. M., & Hsieh, D. P. (1976). Pathways of microbial metabolism of parathion. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(1), 63-69.
- Nojiri, H., & Tsuda, M. (2005). Functional evolution of bacteria in degradation of environmental pollutants. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 50(12), 1505–1509.
- Ortiz, I., Avila-Chávez, M. A., & Torres, L. G. (2014). Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 4(1), 26-46.
- Ortiz-Hernández M. L, Sánchez-Salinas E., Castrejón-Godínez M. L., Dantán-González E., & Popoca-Ursino E.C. (2013b). Mechanisms and strategies for pesticide biodegradation: opportunity for waste, soils and water cleaning. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29 (Número especial sobre plaguicidas) 85-104.
- Ortiz-Hernández, M. L., Castrejón-Godínez, M. L., Popoca-Ursino, E. C., Cervantes-Dacasa, F. R., & Fernández-López, M. (2018). Strategies for biodegradation and bioremediation of pesticides in the environment. In *Strategies for Bioremediation of Organic and Inorganic Pollutants* (pp. 95-115). CRC Press.
- Ortiz-Hernández, M. L., Sánchez-Salinas, E., Dantán-González, E., & Castrejón-Godínez, M. L. (2013a). Pesticide biodegradation: mechanisms, genetics and strategies to enhance the process. In *Biodegradation-life of science*. Intech. 251-287.
- Ortiz-Hernández, M. L., Sánchez-Salinas, E., Olvera-Velona, A., & Folch-Mallol, J. L. (2011). Pesticides in the environment: impacts and their biodegradation as a strategy for residues treatment. *Pesticides Formulations, Effects, Fate*. ISBN, 978-953.
- Popoca-Ursino E. C. (2012). Aislamiento de bacterias con capacidad de degradación de plaguicidas organofosforados, evaluación molecular de sus actividades. Tesis de la Maestría en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Cuernavaca, Morelos, México.
- Popoca-Ursino, E. C., Martínez-Ocampo, F., Dantán-González, E., Sánchez-Salinas, E., & Ortiz-Hernández, M. L. (2017). Characterization of methyl parathion degradation by a

- Burkholderia zhejiangensis* strain CEIB S4-3 isolated from agricultural soils. *Biodegradation*, 28(5-6), 351-367.
- Pose, D., De Ben, S. Delfino, N., & Burger, M. (2000). Intoxicación aguda por organofosforados. Factores de riesgo. *Revista Médica del Uruguay*, 1(16), 5-13.
- Qiu, X. H., Bai, W. Q., Zhong, Q. Z., Li, M., He, F. Q., & Li, B. T. (2006). Isolation and characterization of a bacterial strain of the genus *Ochrobactrum* with methyl parathion mineralizing activity. *Journal of Applied Microbiology*, 101(5), 986-994.
- Ramanathan, M. P., & Lalithakumari, D. (1999). Complete mineralization of methyl parathion by *Pseudomonas* sp. A3. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 80(1), 1-12.
- Ramírez, J. A., & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 4(2), 67-75.
- Rodríguez, D. T. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Revista Ecosistemas*, 12(2), 1-6.
- Schaaf, A. A. (2013). Uso de pesticidas y toxicidad: relevamiento en la zona agrícola de San Vicente, Santa Fe, Argentina. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(2), 323-331.
- Shalaby, S., & Abdou, G. (2010). The influence of soil microorganisms and bio-or-organic fertilizers on dissipation of some pesticides in soil and potato tubers. *Journal of Plant Protection Research*, 50(1), 86-92.
- Singh, B. K. (2009). Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology*, 7(2), 156-164.
- Singh, B. K., & Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 428-471.
- Symons, Z. C., & Bruce, N. C. (2006). Bacterial pathways for degradation of nitroaromatics. *Natural Product Reports*, 23(6), 845-850.
- Tomita, R. Y., & Beyruth, Z. (2002). Toxicología de agrotóxicos em ambiente aquático. *Biológico*, 64(2), 135-142.
- Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. (2011). Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere*, 82(3), 291-307.
- Vikram, S., Pandey, J., Bhalla, N., Pandey, G., Ghosh, A., Khan, F., Jain R. K. & Raghava, G. P. (2012). Branching of the p-nitrophenol (PNP) degradation pathway in *Burkholderia* sp.

Strain SJ98: Evidences from genetic characterization of PNP gene cluster. *AMB Express*, 2(1), 30.

Vikram, S., Pandey, J., Kumar, S., & Raghava, G. P. S. (2013). Genes involved in degradation of para-nitrophenol are differentially arranged in form of non-contiguous gene clusters in *Burkholderia* sp. strain SJ98. *PloS One*, 8(12), e84766.

## CAPÍTULO I

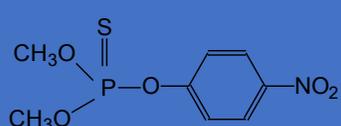
### DEGRADACIÓN DEL PARATIÓN METÍLICO POR LA CEPA *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

El Paratión Metílico (PM) es uno de los insecticidas organofosforados desarrollados para sustituir a los organoclorados. Aunque su uso es restringido, es utilizado en la agricultura para el control de plagas en cultivos algodón, ajo, arroz, papa, café, cebolla, frijol, tabaco, maíz, soya, tomate y trigo; debido a su alta actividad insecticida es utilizado en la acuicultura, en casas habitación e industrias (Machado y Fanta, 2003; Monteiro *et al.*, 2006). Presenta un enlace P=S y de acuerdo con Sharma (2015) es extremadamente peligroso para mamíferos. En cuanto a los efectos sobre la salud, se cataloga por la Organización Mundial de la Salud (OMS) dentro de los compuestos *extremadamente tóxicos* (Tiwari *et al.*, 2018). Esta toxicidad es debido a la conversión metabólica procesada en los hepatocitos donde el grupo P=S se transforma en P=O, el compuesto resultante es el Paraoxón el cual es responsable de la inhibición de varios sistemas enzimáticos como la acetilcolinesterasa, carboxilasa y la fosforilación oxidativa mitocondrial (Machado y Fanta, 2003). La acción biológica de los plaguicidas organofosforados es principalmente la inhibición de la función de la acetilcolinesterasa, que causa un efecto tóxico por la acumulación del neurotransmisor acetilcolina en la sinapsis (Gowda *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2016). Algunas características importantes de paratión metílico se presentan en la tabla 1.1.

**Tabla 1.1.** Características generales y estructura química de Paratión Metílico (Chem Service, 2005).

DESCRIPCIÓN	
<b>Nombre comercial:</b>	Folidol
<b>Fórmula condensada:</b>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>5</sub> PS
<b>Nombre IUPAC:</b>	O,O-Dimetil-O-p-nitrofenil fosforoditioato
<b>Peso molecular:</b>	263.22 g/mol
<b>Solubilidad en agua:</b>	55-60 mg/L
<b>Solubilidad en solventes:</b>	Soluble en la mayoría de los solventes orgánicos
<b>Presión de vapor:</b>	0.97×10 <sup>-5</sup> a 20°C
<b>Punto de fusión:</b>	37-38°C
<b>Punto de ebullición:</b>	100-143°C
<b>Densidad:</b>	1.358 g/mL



## 1.2. DEGRADACIÓN DEL PARATIÓN METÁLICO

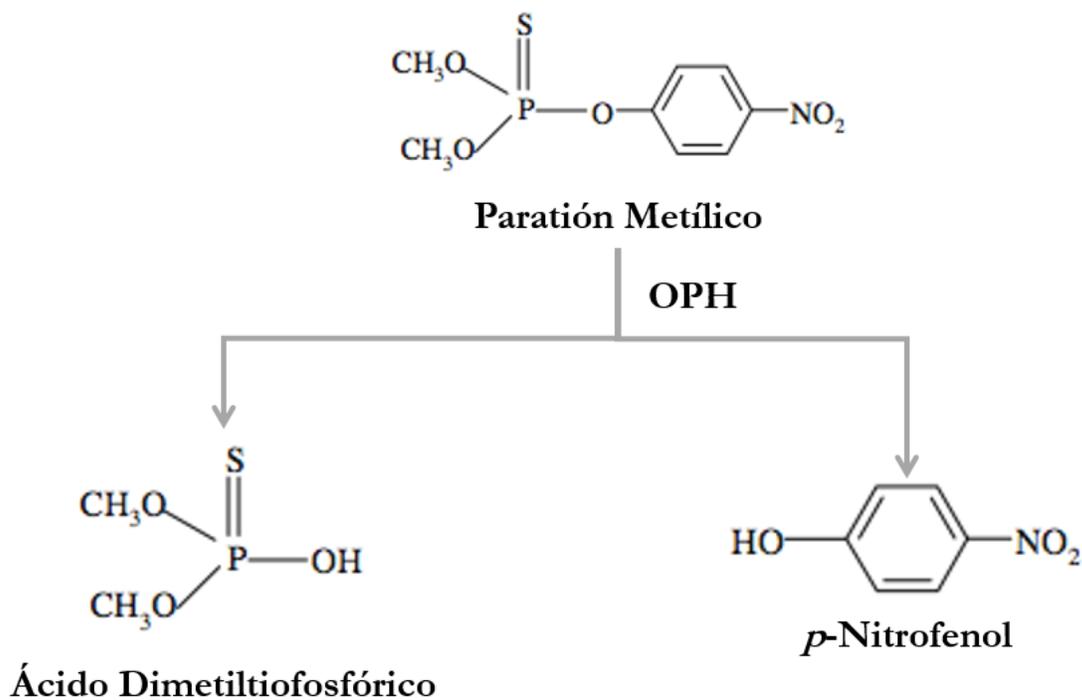
Diferentes enzimas microbianas presentan la capacidad de hidrolizar el PM, como la hidrolasa de organofosforados (OPH) o paratión hidrolasa, codificada en el gen *opd*; la metil paratión hidrolasa (MPH), codificada en el gen *mpd*; la fosfotriesterasa de hidrólisis de coroxón (HOCA), codificada por el gen *hocA*, las cuales fueron aisladas de *Flavobacterium* sp., *Plesiomonas* sp. M6 y *Pseudomonas motteilli*, respectivamente (Horne *et al.*, 2002; Chino-Flores *et al.*, 2012). La degradación del PM está bien documentada, a continuación, se mencionan algunos estudios:

Rani y Lalithakumari (1994) reportan que *Pseudomonas putida* utiliza el PM como única fuente de carbono y fósforo, presenta la enzima anhidrolasa ácida de organofosforados (OPAA), la cual

hidroliza al PM en *p*-nitrofenol (PNF). Posteriormente el PNF es degradado en hidroquinona y 1,2,4-bencenotriol, este último metabolito es transformado por bencenotriol oxigenasa a maleil acetato. Pakala *et al.* (2007) reportan la degradación de PM y PNF por *Serratia* sp. cepa DS001, la bacteria es capaz de utilizar el PM como fuente de carbono. Liu *et al.* (2007) reportan la biodegradación de PM por *Acinetobacter radioresistens* USTB-04, la cual se puede incrementar en presencia de fosfato y urea. Shen *et al.* (2010) reportan que la cepa *Stenotrophomonas* sp. SMSP-1 aislada de lodos provenientes del tratamiento de aguas residuales, es capaz de hidrolizar el PM a PNF. Además, esta cepa es capaz de hidrolizar a otros plaguicidas organofosforados como fenitrothion, paration etílico, fention y foxim. Ekkhunnatham *et al.* (2012) mencionan una MPH nativa de *Burkholderia cepacia* es capaz de hidrolizar el PM. Fernández-López *et al.* (2017) reportan un incremento significativo en la hidrólisis de PM y degradación de PNF por *Burkholderia cenocepacia* cepa CEIB S5-2 cuando las células se encuentran inmovilizadas sobre alguna fibra orgánica. Popoca-Ursino *et al.* (2017) reportan la capacidad de la bacteria *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en hidrolizar el PM y degradar el PNF, además, menciona que la cepa presenta los genes involucrados en la ruta de degradación del PNF por ambas vías.

En general el paso inicial para la degradación del PM es una hidrólisis, con lo que se generan dos metabolitos: el Ácido dimetilfosfórico y PNF. Esta reacción es catalizada por la enzima OPH o paratión hidrolasa, codificada en el gen denominado *opd* (degradador de organofosforados), la cual fue identificada por Sedar *et al.* (1982) en *Pseudomonas diminuta* (Figura 1.1). El PNF no solo es generado durante el proceso de hidrólisis de los plaguicidas organofosforados, sino también constituye un contaminante ambiental muy común, producto ampliamente utilizado para la fabricación de productos farmacéuticos, explosivos, medicamentos, colorantes y agroquímicos (Trapido y Kallas, 2000; Chauhan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Martínez-Ocampo, 2015). Además, es considerado un contaminante potencialmente tóxico, aunque menos tóxico que el paratión metílico (Zhang *et al.*, 2009). Presenta toxicidad hacia la microflora del suelo, puede causar la muerte de varios invertebrados y también plantea un riesgo para la salud humana. Por

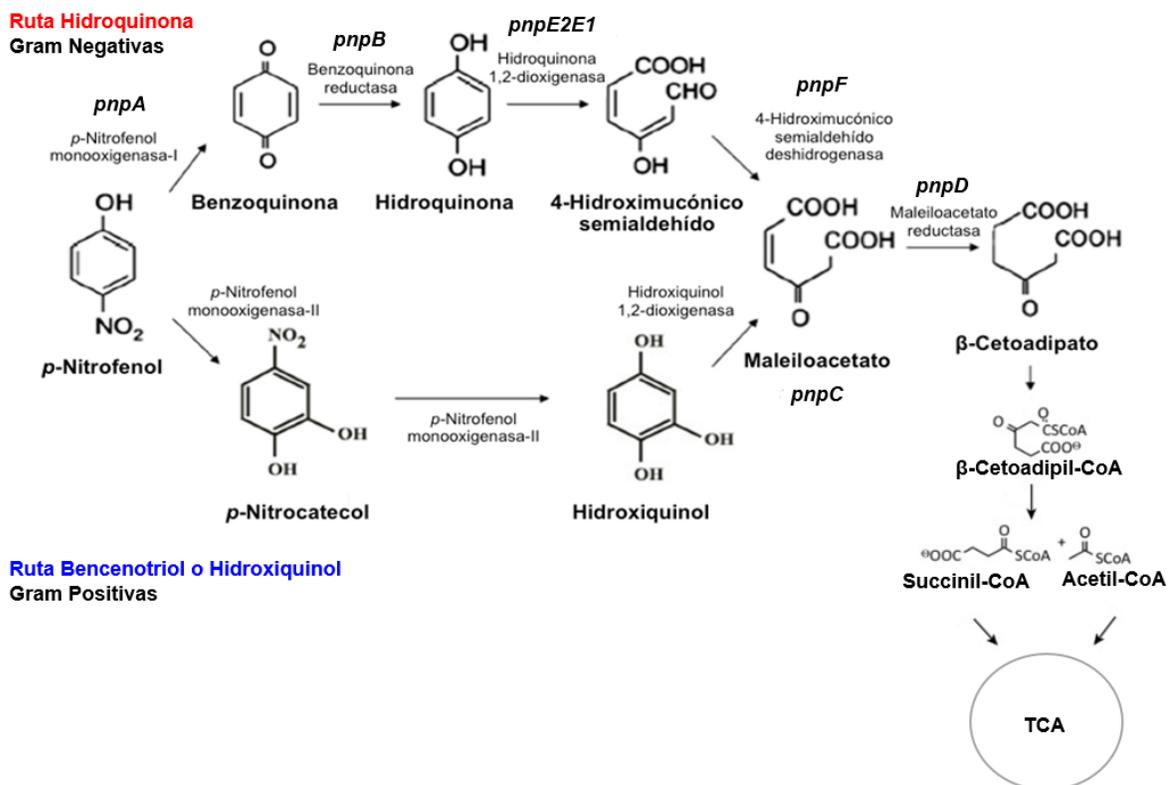
otro lado, el PNF se encuentra en la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos (Nielsen e Ingvorsen, 2013).



**Figura 1.1.** Hidrólisis del paratión metílico por acción de la enzima OPH.

Existen dos vías oxidativas reportadas para la degradación del PNF, identificadas con base en sus intermediarios (Figura 1.2). La vía de la Hidroquinona (HQ), utilizada principalmente por bacterias Gram negativas como *Moraxella* sp., *Pseudomonas* sp. cepa WBC-3 y *Pseudomonas putida* DLL-E4 (Chen *et al.*, 2016) y la vía del Hidroxiquinol o Bencenotriol (BT) la cual es utilizada por bacterias Gram positivas tales como *Bacillus sphaericus* JS905 y *Rhodococcus opacus* SAO101 (Zhang *et al.*, 2012). No obstante, Chauhan *et al.*, (2010) y Vikram *et al.*, (2012) reportan que la cepa *Burkholderia* sp. cepa SJ98, una bacteria Gram negativa, es capaz de realizar la degradación de PNF a través de la vía BT y por la HQ, utilizándolo como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Min *et al.*, 2017).

En otro reporte, Zhang *et al.*, (2012) describieron que la cepa *Pseudomonas sp.* 1-7, bacteria Gram negativa, presenta genes correspondientes a ambas vías de degradación del PNF, el conjunto de genes *pdcABCDEFG*, involucrados en la vía HQ, así como los genes *pdcCG* involucrados en la vía BT.



**Figura 1.2.** Rutas de degradación del PNF (Modificada de Martínez-Ocampo, 2015).

### 1.3. OBJETIVO

Caracterizar el crecimiento de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y su capacidad de degradación del paratión metílico.

## 1.4. METODOLOGÍA

### 1.4.1. Plaguicida paratión metílico

Se utilizó Paratión Metílico (PM) grado analítico (O,O-Dimetil-O-p-nitrofenil fosforoditioato) con 98% de pureza (Ultra Scientific, Analytical Standards, E.E.U.U.). Se preparó un stock de PM (10,000 mg/L) utilizando metanol de calidad HPLC como disolvente.

### 1.4.2. Preparación del pre inóculo

Seis cultivos independientes de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 fueron incubados durante 12 horas, a 30°C con agitación (150 rpm), en 250 mL Caldo de Soya Trypticaseína, hasta alcanzar una densidad óptica (600 nm) de 1.0. Posteriormente, la pastilla de cada matraz se colectó por centrifugación durante 10 minutos a 4°C y 10,000 rpm; las pastillas se lavaron y se resuspendieron en cinco mL de Medio de Sales Minerales (MSM) cuya composición en g/L se muestra en la tabla 1.2, de acuerdo a lo reportado por Popoca-Ursino (2012). Las seis pastillas obtenidas fueron utilizadas como pre inóculos para las cinéticas de crecimiento con la cepa, en un total de 36 matraces y a una densidad óptica inicial de 0.5 (600 nm).

### 1.4.3. Cultivo de la bacteria *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en presencia del plaguicida paratión metílico

Para verificar la capacidad de degradación de PM por la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y caracterizar su crecimiento, se realizaron cultivos en batch de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 partiendo de una densidad óptica de 0.5 (600 nm), se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de MSM previamente esterilizado.

**Tabla 1.2.** Composición del medio de sales minerales.

COMPUESTO	CANTIDAD (g/L)
<b>SOLUCIÓN A</b>	
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0.82
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.19
<b>MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	0.20
<b>KNO<sub>3</sub></b>	2.00
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0.99
<b>SOLUCION B*</b>	
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	2.80
<b>MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O</b>	2.55
<b>CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O</b>	0.17
<b>CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O</b>	2.43
<b>ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	0.25
<b>pH 7.0 ± 0.05</b>	

\*Agregar 2 mL de la solución B por cada litro de solución A.

Los cultivos se llevaron a cabo durante 27 horas en ausencia y presencia del plaguicida, evaluando dos concentraciones finales diferentes: 50 mg/L y 100 mg/L. Las condiciones fueron las siguientes: tres matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de B.z+MSM+50 mg/L de PM (B.z= *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3) y tres matraces B.z+MSM+100 mg/L de PM para medir el crecimiento y el PNF; además, de tres matraces Erlenmeyer de la misma capacidad, con 50 mL de MSM+100 mg/L de PM para el control negativo, tres matraces con 50 mL de B.z+MSM para el control positivo. Los matraces se incubaron a 30°C con agitación constante a 150 rpm. Durante este tiempo, se midió el crecimiento a través del monitoreo de la densidad óptica a 600 nm. La hidrólisis del PM se monitoreó mediante la liberación de PNF y la

concentración del PNF se midió a una longitud de onda de 400 nm, ambos fueron registrados en un espectrofotómetro BioMate 3 de Thermo Scientific cada tres horas.

En los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento, se observaron mejores resultados a una concentración de 50 mg/L, pues se logró la degradación del metabolito PNF en un menor tiempo (12 horas) comparado con la cinética de 100 mg/L que fue a las 21 horas (ver sección de resultados en este capítulo y figura 1.3).

Por tal motivo, posteriormente las cinéticas de crecimiento y degradación se llevaron a cabo solo a una concentración final de 50 mg/L. Estos cultivos fueron realizados para tomar muestras que proporcionaran la siguiente información: a) Caracterizar la degradación del PM, b) Analizar los cambios transcripcionales de la cepa (capítulo 2) y, c) analizar la expresión de proteínas de la cepa (capítulo 3), ambos durante la degradación del PM.

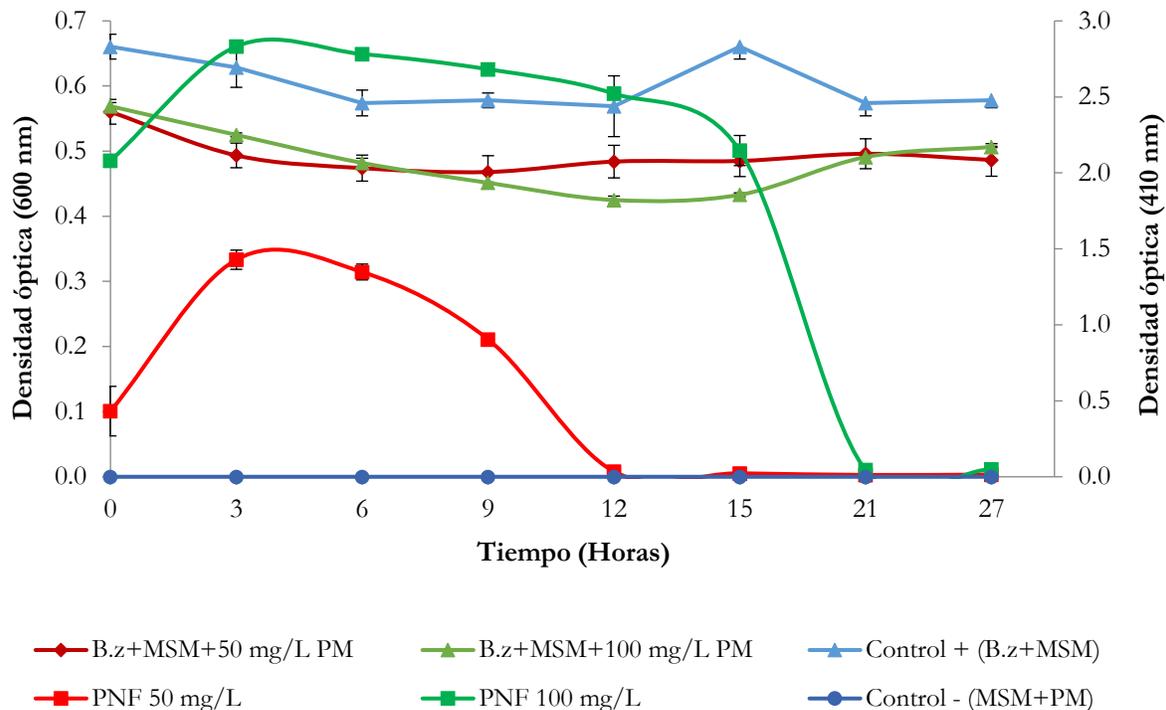
La biomasa fue colectada al inicio de la cinética (cero horas); a las tres horas, que corresponde al momento en que se detectó la máxima concentración de PNF, después de que se lleva a cabo la hidrólisis del PM; y finalmente a las nueve horas, donde la concentración del PNF ha disminuído considerablemente respecto a las tres horas. Las muestras se colectaron por centrifugación a 3,500 rpm por 10 minutos a 4°C en tubos Falcon de 50 mL, en presencia de 400 µL de RNAlater. Posteriormente fueron congeladas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C para la posterior extracción de RNA y de proteínas (ver capítulos 2 y 3).

## 1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.5.1. Cinéticas de crecimiento de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3

Durante las cinéticas de crecimiento a 50 y 100 mg/L de PM, se observa que la cepa no experimenta un crecimiento, sino que más bien se mantienen en el medio de cultivo. En ambas

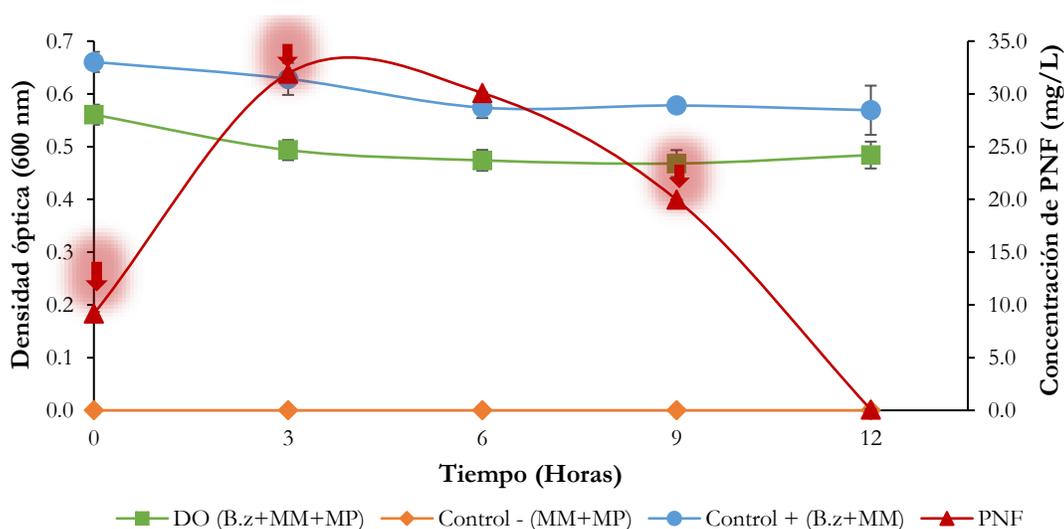
cinéticas se observa la máxima concentración del metabolito PNF a las tres horas, una disminución del metabolito a partir de las seis horas y la cepa refleja un ligero incremento en el crecimiento en la cinética de 50 mg/L, lo que podría relacionarse con una capacidad de la cepa para utilizar el PM como fuente de carbono y energía. Sin embargo, en la cinética de 100 mg/L no se muestra este incremento en el crecimiento, probablemente debido al efecto tóxico del PNF. Finalmente, en la cinética suplementada con 50 mg/L de PM, la degradación completa del PNF se observa a las 12 horas, mientras que en la cinética con 100 mg/L del PM se observa la degradación del PNF en un tiempo más amplio (21 horas). Además en esta condición experimental se observa una fase de adaptación de 12 horas, la que no sucede en la condición de 50 mg/L (Figura 1.3). Por lo tanto se observaron mejores resultados a una concentración de 50 mg/L, ya que se logró la degradación del metabolito PNF en un menor tiempo. En los controles, de MSM y la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 no se observaron cambios significativos a pesar de obtener una densidad óptica de  $\sim 0.5$ , y en el control negativo, el MSM con el PM los matraces se mantuvieron en una lectura de cero durante las cinéticas, es decir que no se presentó una hidrólisis del PM y por lo tanto no se generó el PNF. Por lo que se demuestra que a hidrólisis del plaguicida y la degradación del PNF es mediada por la presencia de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3.



**Figura 1.3.** Cinética de crecimiento y degradación de PM a 50 y 100 mg/L de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3.

A partir de los resultados anteriores, se repitió la cinética de crecimiento y degradación, pero a una concentración de 50 mg/L. Durante la cinética, se midió la densidad óptica a 600 nm para el monitoreo del crecimiento de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y a 410 nm para la generación y degradación del PNF (metabolito resultante del hidrólisis del PM). Se observó un incremento a las tres horas en el PNF y la cepa disminuye en su crecimiento debido a la presencia de este metabolito. Si bien la cepa no experimenta un crecimiento, las células podrían mantenerse en el medio de cultivo, a una concentración tal que son capaces de degradar al PNF. Posteriormente, se observa una disminución de la concentración del PNF a las seis horas (Figura 1.4), y su completa degradación a las 12 horas.

Por otro lado, con respecto a la generación y degradación del PNF, se observó que al inicio de la cinética (cero horas), que corresponde a un tiempo de entre 5-10 minutos de exposición al PM, se obtuvo una concentración de PNF de 9.2 mg/L; posteriormente de 31.9 mg/L y de 20 mg/L a las tres y nueve horas, respectivamente (Figura 1.4). En los controles, de MSM y la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 no se observaron cambios en la absorbancia significativos a pesar de obtener una densidad óptica de  $\sim 0.5$ , que podría ser debido a la falta de una fuente de carbono en el MSM. En el control negativo, el MSM con el PM los matraces se mantuvieron en una lectura de cero durante las cinéticas. Asimismo, se observa que la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 llevó a cabo la degradación del PNF en 12 horas. Popoca-Ursino (2012) observó una degradación del PNF en un tiempo de 15 horas con la misma concentración del plaguicida y con esta misma cepa, pero a una concentración de inóculo de 0.1 de densidad óptica. Por lo tanto, la velocidad de generación y degradación del PNF obtenido en este trabajo está relacionado con la mayor concentración bacteriana en este ensayo.



**Figura 1.4.** Cinética de crecimiento y degradación de PM de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3, a una concentración final de 50 mg/L.

La cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 fue aislada de suelo agrícola con un historial previo de aplicaciones de plaguicidas organofosforados (Popoca-Ursino, 2012) y presenta la capacidad de hidrolizar el PM a las tres horas y degradar el PNF a las 12 horas (50 mg/L) y en la concentración de 100 mg/L se degrada a las 21 horas. Existen escasas bacterias que son capaces de hidrolizar el PM y degradar el PNF, debido a la toxicidad del PNF. Existen diversos reportes sobre la alta toxicidad del PNF para algunos microorganismos, por lo cual las altas concentraciones de compuestos nitro-aromáticos limitan su degradación (Samuel *et al.*, 2014), motivo por el cual generalmente se estudian concentraciones bajas. Asimismo, Ismail y Gescher (2012) reportan que los compuestos aromáticos son resistentes a la biomineralización debido a una mayor estabilidad causada por la resonancia del anillo aromático. Fernández-López (2017) menciona que las bajas concentraciones de PNF permiten el crecimiento microbiano y la degradación de este compuesto. Sin embargo, mencionan que concentraciones de PNF mayores a 25 mg/L inhiben totalmente el crecimiento de la cepa *Burkholderia* sp. S5-2. En este trabajo, a las tres horas se presenta una concentración cercana a los 32 mg/L, no se muestra una inhibición completa del crecimiento a esta concentración, pero sí se observa una ligera disminución en el registro de absorbancia debido a la presencia del PNF, lo que permite que las bacterias aún presentes en el cultivo realicen la degradación de este metabolito.

Pakala *et al.* (2007) evaluaron una cepa denominada *Serratia* sp. cepa DS001 con la capacidad de utilizar al plaguicida PM y PNF como fuentes de carbono, utilizando concentración de 0.6 y 0.3 mM, respectivamente. En este estudio se utilizaron concentraciones de 0.2 y 0.4 mM de paratión metílico, que, de acuerdo a la estequiometría de la reacción, al hidrolizarse genera una concentración equimolar de PNF. Es probable que las concentraciones utilizadas en este estudio no permitan el crecimiento de la bacteria y que el carbono obtenido de la degradación de estos compuestos solo sea suficiente para el mantenimiento de la población bacteriana existente.

Por lo tanto, la capacidad que presenta la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 de hidrolizar el PM y degradar el PNF la convierte en una herramienta biotecnológica para la biorremediación.

## 1.6. CONCLUSIONES

- La cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 es capaz de hidrolizar el PM en un período de tiempo muy corto, ya que a los 10-15 minutos después de haberla puesto en contacto con el plaguicida fue posible observar la generación del PNF.
- *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 es capaz de degradar totalmente al PNF generado a partir de 50 mg/L de MP en un tiempo de 12 horas.

## 1.7. LITERATURA CONSULTADA

- Chauhan, A., Pandey, G., Sharma, N. K., Paul, D., Pandey, J., & Jain, R. K. (2010). p-Nitrophenol degradation via 4-nitrocatechol in *Burkholderia* sp. SJ98 and cloning of some of the lower pathway genes. *Environmental Science & Technology*, 44(9), 3435-3441.
- Chem service. (2005). Certificate of analysis. Catalogo #: PS-94. Cas #: 298-00-0.
- Chen, Q., Tu, H., Luo, X., Zhang, B., Huang, F., Li, Z., Wang J., Shen W., Wu J., & Cui, Z. (2016). The Regulation of para-Nitrophenol Degradation in *Pseudomonas putida* DLL-E4. *PLoS one*, 11(5), e0155485.
- Chino-Flores, C., Dantán-González, E., Vázquez-Ramos, A., Tinoco-Valencia, R., Díaz-Méndez, R., Sánchez-Salinas, E., Castrejón-Godínez Ma. L., Ramos-Quintana F. & Ortiz-Hernández, M. L. (2012). Isolation of the opdE gene that encodes for a new hydrolase of *Enterobacter* sp. capable of degrading organophosphorus pesticides. *Biodegradation*, 23(3), 387-397.
- Ekkhunnatham, A., Jongsareejit, B., Yamkunthong, W., & Wichitwechkarn, J. (2012). Purification and characterization of methyl parathion hydrolase from *Burkholderia cepacia* capable of degrading organophosphate insecticides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1739-1746.

- Fernández-López, M. G. (2017). Degradación de plaguicidas organofosforados por bacterias inmovilizadas en diferentes soportes: aspectos bioquímicos, toxicológicos y moleculares. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Fernández-López, M. G., Popoca-Ursino, C., Sánchez-Salinas, E., Tinoco-Valencia, R., Folch-Mallol, J. L., Dantán-González, E., & Laura Ortiz-Hernández, M. (2017). Enhancing methyl parathion degradation by the immobilization of *Burkholderia* sp. isolated from agricultural soils. *MicrobiologyOpen*, 6(5), e00507.
- Gowda, G. H. P., Venkateshaiah, V., & Krishnamurthy, S. V. B. (2016). Effect of Methyl Parathion on Survival and Development of Tadpoles of Indian Cricket frog *Fejervarya limnocharis*. *Journal of Tropical Life Science*, 6(1), 41-46.
- Horne, I., Sutherland, T. D., Oakeshott, J. G., & Russell, R. J. (2002). Cloning and expression of the phosphotriesterase gene *hocA* from *Pseudomonas monteilii* C11b. *Microbiology*, 148(9), 2687-2695.
- Ismail, W., & Gescher, J. (2012). The Epoxy Coenzyme-A Thioesters Pathways for Degradation of Aromatic Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-00633.
- Liao, X., Zhang, C., Liu, Y., Luo, Y., Wu, S., Yuan, S., & Zhu, Z. (2016). Abiotic degradation of methyl parathion by manganese dioxide: Kinetics and transformation pathway. *Chemosphere*, 150, 90-96.
- Liu, F. Y., Hong, M. Z., Liu, D. M., Li, Y. W., Shou, P. S., Hai, Y. A. N., & Shi, G. Q. (2007). Biodegradation of methyl parathion by *Acinetobacter radioresistens* USTB-04. *Journal of Environmental Sciences*, 19(10), 1257-1260.
- Machado, M. R., & Fanta, E. (2003). Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(3), 361-372.
- Martínez-Ocampo, F. (2015). Ensamblaje del genoma de *Burkholderia* sp. y análisis de la anotación funcional de genes involucrados en la degradación de compuestos organofosforados. Tesis de Maestría en Biotecnología. Centro de Investigación en

- Biotecnología (CEIB), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Cuernavaca, Morelos, México.
- Min, J., Wang, B., & Hu, X. (2017). Effect of inoculation of *Burkholderia* sp. strain SJ98 on bacterial community dynamics and para-nitrophenol, 3-methyl-4-nitrophenol, and 2-chloro-4-nitrophenol degradation in soil. *Scientific Reports*, 1-9.
- Monteiro, D. A., De Almeida, J. A., Rantin, F. T., & Kalinin, A. L. (2006). Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(2), 141-149.
- Nielsen, M. B., & Ingvorsen, K. (2013). Biodegradation of para-nitrophenol by *Citricoccus nitrophenolicus* strain PNP1 T at high pH. *Biodegradation*, 24(1), 79-87.
- Pakala, S. B., Gorla, P., Pinjari, A. B., Krovídi, R. K., Baru, R., Yanamandra, M., Merrick M. & Siddavattam, D. (2007). Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol: evidence for the presence of a p-nitrophenol 2-hydroxylase in a Gram-negative *Serratia* sp. strain DS001. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(6), 1452-1462.
- Popoca-Ursino E. C. (2012) Aislamiento de bacterias con capacidad de degradación de plaguicidas organofosforados, evaluación molecular de sus actividades. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Popoca-Ursino, E. C., Martínez-Ocampo, F., Dantán-González, E., Sánchez-Salinas, E., & Ortiz-Hernández, M. L. (2017). Characterization of methyl parathion degradation by a *Burkholderia zhejiangensis* strain CEIB S4-3 isolated from agricultural soils. *Biodegradation*, 28(5-6), 351-367.
- Rani, N. L., & Lalithakumari, D. (1994). Degradation of methyl parathion by *Pseudomonas putida*. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(12), 1000-1006.
- Samuel, M. S., Sivaramakrishna, A., & Mehta, A. (2014). Bioremediation of p-Nitrophenol by *Pseudomonas putida* 1274 strain. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12(1), 53.

- Serdar, C. M., Gibson, D. T., Munnecke, D. M., & Lancaster, J. H. (1982). Plasmid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), 246-249.
- Sharma, J. (2015). A review on in situ biodegradation of methyl parathion through soil microbes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(5), 632-649.
- Shen, Y. J., Lu, P., Mei, H., Yu, H. J., Hong, Q., & Li, S. P. (2010). Isolation of a methyl parathion-degrading strain *Stenotrophomonas* sp. SMS-1 and cloning of the ophc2 gene. *Biodegradation*, 21(5), 785-792.
- Tiwari, B., Verma, E., Chakraborty, S., Srivastava, A. K., & Mishra, A. K. (2018). Tolerance strategies in cyanobacterium *Fischerella* sp. under pesticide stress and possible role of a carbohydrate-binding protein in the metabolism of methyl parathion (MP). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 127, 217-226.
- Trapido, M., & Kallas, J. (2000). Advanced oxidation processes for the degradation and detoxification of 4-nitrophenol. *Environmental Technology*, 21(7), 799-808.
- Vikram, S., Pandey, J., Bhalla, N., Pandey, G., Ghosh, A., Khan, F., Jain K. R., & Raghava, G. P. (2012). Branching of the p-nitrophenol (PNP) degradation pathway in *Burkholderia* sp. Strain SJ98: Evidences from genetic characterization of PNP gene cluster. *AMB Express*, 2(1), 1-10.
- Zhang, J. J., Liu, H., Xiao, Y., Zhang, X. E., & Zhou, N. Y. (2009). Identification and characterization of catabolic para-nitrophenol 4-monooxygenase and para-benzoquinone reductase from *Pseudomonas* sp. strain WBC-3. *Journal of Bacteriology*, 191(8), 2703-2710.
- Zhang, S., Sun, W., Xu, L., Zheng, X., Chu, X., Tian, J., Wu, N. & Fan, Y. (2012). Identification of the para-nitrophenol catabolic pathway, and characterization of three enzymes involved in the hydroquinone pathway, in pseudomonas sp. 1-7. *BMC Microbiology*, 12(1), 27.

## CAPÍTULO II

### ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS TRANSCRIPCIONALES DE cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 DURANTE LA DEGRADACIÓN DEL PARATIÓN METÁLICO

#### 2.1. INTRODUCCIÓN

Recientemente se han desarrollado nuevas estrategias para la búsqueda e identificación de enzimas relacionadas con el proceso de degradación de plaguicidas, tales como la regulación transcripcional, el comportamiento cinético y la relación estructura-función de las enzimas involucradas en el proceso (Svedružić *et al.*, 2005). Los métodos de secuenciación masiva del DNA han hecho posible el analizar masivamente la expresión de los genes bajo diferentes condiciones ambientales (transcriptoma).

El transcriptoma se refiere al subconjunto de genes transcritos en cualquier organismo, constituyendo un vínculo entre el genoma y el proteoma. La transcripción es un paso esencial en la expresión de genes y su conocimiento es de gran interés en la biología molecular y celular. La investigación en esta área es indispensable para descifrar los elementos funcionales del genoma y determinar cuando los genes son expresados y de qué forma son regulados (Soto y López, 2014). Además, es uno de los procesos clave para la adaptación a los cambios de las condiciones ambientales y por lo tanto para la supervivencia (Singh y Nagaraj, 2006).

En la década de los ochenta, los *northern blots*, y en los noventa los *microarreglos*, los *RT-PCR*, los *cDNA-AFLP* y el análisis serial de expresión de genes SAGE (*del inglés Serial Analysis of Gene Expression*), entre otras técnicas (Lowe *et al.*, 2017), permitieron el desarrollo y generación de conocimiento en transcriptómica, al estudiar la expresión de genes relacionados con respuestas a estímulos o a condiciones particulares, así como para determinar cambios en los patrones de expresión génica. Sin embargo, estas estrategias resultan limitantes al estar basadas en hibridación

(por ejemplo microarreglos, Northern blots), tener baja cobertura y en algunos casos necesitan algún conocimiento previo de la secuencia del genoma para su implementación (Ward *et al.*, 2012; Soto y López, 2014).

Actualmente, y gracias a los avances en las técnicas de secuenciación del DNA y a través de tecnologías de nueva generación NGS (del inglés Next Generation Sequencing), han revolucionado campos como los de la genómica y la transcriptómica. Estas tecnologías no solo permiten generar información masivamente, sino también entender el proceso de expresión génica (Soto y López, 2014).

El RNA-seq es una tecnología recientemente desarrollada y disponible en las compañías Roche/454, Solexa/Illumina (Strickler *et al.*, 2012), de gran utilidad para analizar simultáneamente un gran número de transcritos en un solo ensayo y proporciona una cobertura completa de transcritos (Sugganth *et al.*, 2015; Hrdlickova *et al.*, 2017). La información de esta manera puede ser integrada e interpretada, y se constituye de gran utilidad para vislumbrar procesos biológicos y mecanismos de coexpresión (Wang *et al.*, 2010).

RNA-seq ha surgido como una poderosa herramienta para el análisis transcriptómico en el campo de la microbiología ambiental (Yan *et al.*, 2016), para el descubrimiento y caracterización de genes relacionados con la tolerancia xenobiótica, procesos de biodegradación y el campo de biorremediación (Zhang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016; Albers *et al.*, 2018).

Varios autores reportan estudios transcriptómicos de plaguicidas sobre microorganismos como *Klebsiella pneumoniae* CG43 sobre Paraquat (Huang *et al.*, 2013); *Penicillium digitatum* sobre Prochloraz (Liu *et al.*, 2015); *Trichoderma atroviride* T23 sobre 2,2-diclorovinil dimetilfosfato (Dichlorvos) (Zhang *et al.*, 2015); *Pseudomonas putida* DLL-E4 durante la degradación de p-nitrofenol (PNF) (Chen *et al.*, 2016), *Mycobacterium tuberculosis* sobre Paraquat (Namouchi *et al.*,

2016); otro estudio es el de Tiwari *et al.* (2018) con *Fischerella sp.*, capaz de degradar el paratión metílico (PM).

El estudio del transcriptoma nos permite conocer el patrón de expresión de los genes que coordinan la respuesta a la biodegradación de los plaguicidas, además de identificar diversos procesos biológicos que ocurren dentro de la célula.

## 2.2. OBJETIVO

Analizar y caracterizar el transcriptoma de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en respuesta a la presencia y ausencia del plaguicida paratión metílico.

## 2.3. METODOLOGÍA

Para poder cumplir con el objetivo que se plantea en este capítulo, se parte de los cultivos realizados y reportados en el capítulo 1, desde los cuales se obtuvieron 18 muestras para el análisis de transcriptoma y 18 para el análisis de proteoma, como a continuación se enlistan:

1. Al inicio de la cinética en el tratamiento donde *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 se puso en contacto con el PM (inmediatamente se registró la presencia del PNF).
2. Al inicio de la cinética con *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en ausencia de PM.
3. A las tres horas con la cepa en presencia del PM, donde el PNF alcanza su máxima concentración.
4. A las tres horas, en ausencia de PM.
5. A las nueve horas en presencia de la cepa y cuando el PNF se está degradando.
6. A las nueve horas, en ausencia de PM.

### 2.3.1. Extracción de RNA

La extracción del RNA total de la cepa en cada uno de los puntos de muestreo, se realizó de acuerdo al protocolo del Kit TRI Reagent® siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las muestras se trataron con 5 µL de DNAsa I de Thermo Scientific para la eliminación de restos de DNA y finalmente para su posterior purificación, se utilizaron las columnas “RNA Clean and Concentrator” de la marca Zymo Research. La concentración de RNA fue determinada por la medición de su absorbancia utilizando el espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific). La integridad del RNA se evaluó mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Las muestras de RNA fueron enviadas a la empresa GENEWIZ Solid Science. Superior Service en Nueva Jersey, Estados Unidos, especialista en Secuenciación Masiva de Nueva Generación (<https://www.genewiz.com>), donde se evaluó la calidad y concentración de las muestras y la eliminación de RNA ribosomales utilizan el protocolo de Ribo-Zero, y la preparación de las librerías y la secuenciación por Illumina HiSeq 2x150 bp por línea, paired end. La empresa solicitó al menos 2 µg de RNA a una concentración mínima de 50 ng/µL. Para evitar la degradación, el transporte del RNA se realizó en hielo seco.

### 2.3.2. Análisis y mapeo de los datos del RNA-seq

Para obtener la identidad de cada mensajero, se utilizó RNA-seq, la cual es una herramienta transcriptómica que cambia la manera de cómo se analizan y comprenden los transcriptomas (Garber *et al.*, 2011).

Los datos obtenidos por el RNA-seq fueron procesados con diversos programas. El inicio del análisis consiste en la obtención del valor de calidad de los datos crudos (programa FastQC) así como la filtración de secuencias de baja calidad y los adaptadores (Programa CutAdapt), además

de secuencias duplicadas (Programa Prinseq). Posteriormente las secuencias fueron alineadas contra el draft del genoma de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 (GenBank bajo el número de acceso JSBM01000001.1), como genoma de referencia, utilizando el programa CLC Genomics Server v. 10.0.1, el alineamiento obtenido fue visualizado utilizando el software IGV (Thorvaldsdóttir *et al.*, 2013) y finalmente para el análisis de expresión se utilizó el programa DESeq2.

Además, se utilizaron las herramientas bioinformáticas y parámetros como el RPKM (del inglés *reads per kilobase of exon per million reads mapped*), que permite cuantificar niveles de transcritos y facilita la comparación entre muestras (Mortazavi *et al.*, 2008). Otro parámetro utilizado fue el “*fold change*” o veces de cambio de las lecturas que corresponde a la división del número de lecturas generadas para un gen particular en una muestra contra el de la otra. Al estimar este parámetro es posible correlacionar la expresión de un gen en dos condiciones distintas, además de establecer radios de expresión génica diferencial entre tratamientos (Auer y Doerge, 2010).

### 2.3.3. Conjunto de Grupos de Ortólogos de Proteínas (COGs)

Los genes expresados diferencialmente de cada tiempo fueron categorizados de acuerdo a su función según las categorías funcionales del COG. La base de datos de COGs tiene como objetivo clasificar en grupos de ortólogos las proteínas de microorganismos que conocemos su genoma completo. Para esto se utilizó la base de datos de Integrated Microbial Genomes & Microbiomes (IMG/M), la cual se encuentra en la siguiente dirección electrónica: <https://img.jgi.doe.gov> de los genes de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3, la cual contenía 7,096 genes. Para realizar este análisis se revisó el listado de genes y se clasificaron de acuerdo con un valor de *veces de cambio*  $\pm 1.5$  y un *p-value* menor a 0.05 (Galperin *et al.*, 2014).

#### 2.3.4. Análisis de la anotación funcional de los genes

Para ubicar a cada uno de los genes expresados diferencialmente, de ambas condiciones, de los tiempos cero, tres y nueve horas, en las vías metabólicas fueron sometidos a un análisis en la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway Color. Se obtuvo el gen Knockout (KO) de la base de datos de Integrated Microbial Genomes & Microbiomes (IMG/M) la cual se encuentra en la dirección electrónica: <https://img.jgi.doe.gov>, y este KO fue utilizado en la base de datos del KEGG ([http://www.genome.jp/kegg/tool/map\\_pathway2.html](http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html)) utilizando a *Burkholderia sp.* RPE67 con el código de organización “bue”.

#### 2.3.5. RT-PCR del gen *mpd* y *pnpC*

Adicionalmente, se realizaron RT-PCR, iniciando con 2 µg de RNA tratado con DNAsa. Se utilizó la enzima retrotranscriptasa para la síntesis del DNA complementario siguiendo el instructivo del producto “RevertAid First Strand cDNA Synthesis” de Thermo Fisher Scientific. Además, para evaluar la expresión de genes específicos, se diseñaron y enviaron a sintetizar tres pares de oligonucleótidos que corresponden al grupo de genes de *recA*, el gen *mpd* involucrado en la hidrólisis del PM y en la ruta de degradación del PNF el gen *pnpC*.

#### 2.3.6. qRT-PCR del gen *mpd* y de los genes *pnpABA* 'E1E2FDC

Con la finalidad de validar los datos transcriptómicos, se utilizó qRT-PCR para obtener una evaluación independiente de la expresión del gen *mpd* y de los genes que integran ambas vías de degradación del PNF.

Se utilizó el kit RevertAid First Strand cDNA (Thermo Scientific) para la síntesis de cDNA a partir de RNA total, el cual fue utilizado como plantilla para los experimentos de qRT-PCR; los primers específicos para gen se presentan en la tabla 2.1. Cada mezcla de reacción contenía 5 µL

de la mezcla de SYBR green PCR (Thermo Scientific), 2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ L del primer forward y reverse y 1  $\mu$ L de cDNA. Las PCR se realizaron en el Rotor-Gene Q (Quiagen) utilizando el siguiente programa: 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. El protocolo de disociación fue de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 20 segundos, seguidos de una rampa de 60°C a 95°C durante 20 minutos. La transcripción de la proteína recombinasa A (*recA*) se utilizó como referencia interna (no regulada) para la cuantificación relativa. Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

**Tabla 2.1.** Primers utilizados para la validación de genes por qRT-PCR.

Gen	Primers
<i>recA</i>	<i>recAf</i> (5'-TAC AGC TAC AAC GGC GAT CG 3') <i>recAr</i> (5'-GCG ATT CGC GGA TCT TGT TC-3')
<i>mpd</i>	<i>mpdf</i> (5'-TAC ATC ACC CAC ATG CAC CC-3') <i>mpdr</i> (5'-ATC GGC TTC TTT CTG GTC CG-3')
<i>pnpC</i>	<i>pnpCf</i> (5'-AAA TCG TCG TTG GTG GTC GA-3') <i>pnpCr</i> (5'-CGC TTG ACG TCG AAA AAG GG-3')
<i>pnpA</i>	<i>pnpAf</i> (5'-AGG AGG TGC GTC GTC GTA TG-3') <i>pnpAr</i> (5'-ATT CAG GTG GTC GAC GCG AT-3')
<i>pnpA'</i>	<i>pnpA'f</i> (5'-TGA AAA GCT CAA CGG CGT GC-3') <i>pnpA'r</i> (5'-ACG AAG CGA CGT CAT TAC TCT-3')
<i>pnpB</i>	<i>pnpBf</i> (5'-GCT ATC GCG CTG CAT TCG AA-3') <i>pnpBr</i> (5'-ACA TGT TGC CGA ATC GCG TC-3')
<i>pnpC</i>	<i>pnpCf</i> (5'-AAA TCG TCG TTG GTG GTC GA-3') <i>pnpCr</i> (5'-CGC TTG ACG TCG AAA AAG GG-3')
<i>pnpD</i>	<i>pnpDf</i> (5'-GCA TTG GCA TAC AAC CGC GA-3') <i>pnpDr</i> (5'-AAC AGC CTG CGG ACC ATC TT-3')
<i>pnpE2</i>	<i>pnpE2f</i> (5'-GCA CTA CGC GAA GTC GAA CG-3') <i>pnpE2r</i> (5'-GGT TCT TCG CGA CAA CCA CC-3')
<i>pnpE1</i>	<i>pnpE1f</i> (5'-CAT GGC GAC GTT CAA GGC AA-3') <i>pnpE1r</i> (5'-TCG CCA TGC TTG CTA CCG TA-3')
<i>pnnF</i>	<i>pnnFf</i> (5'-GCA ATC GAG GCA AAT GCG GA-3') <i>pnnFr</i> (5'-ACG TCA AGA AAG CGC GTG TC-3')
<i>¿pnpG?</i>	<i>¿pnpG?f</i> (5'-GCG AAG TCA TCA TGT GCG CA-3') <i>¿pnpG?r</i> (5'-TTT GCA AGG TCC ATC GAC GC-3')

## 2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

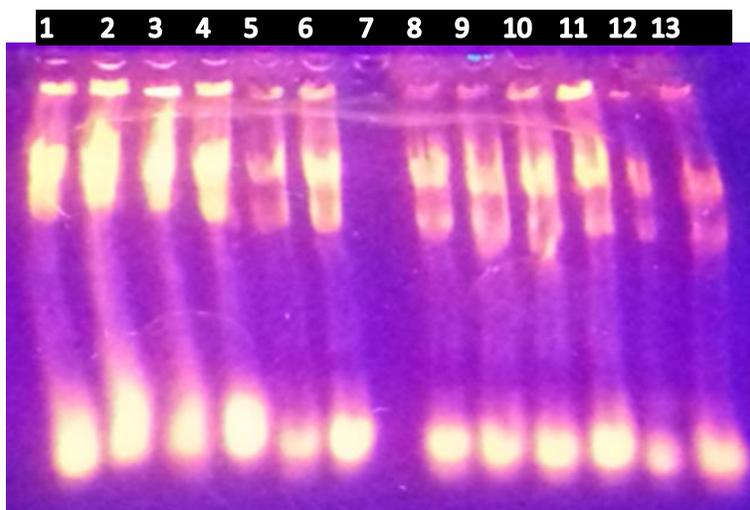
### 2.4.1. Concentración de RNA de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3

La concentración del RNA fue en promedio de 1.7  $\mu\text{g}$ . El grado de pureza del RNA se calculó mediante la relación  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ . Donde  $A_{260}$  es la absorbancia de los ácidos nucleicos a 260 nm;  $A_{280}$  es la absorbancia de las proteínas a 280 nm; y  $A_{230}$  es la absorbancia de los compuestos orgánicos contaminantes a 230 nm. El RNA tuvo una relación  $A_{260}/A_{280}$  entre 1.9 a 2.0 (el grado de pureza óptimo es de 1.8 a 2.0) y una relación  $A_{260}/A_{230}$  de 1.1 a 2.3 (el grado de pureza óptimo es de 2.0 a 2.2) (Tabla 2.2). Estos resultados indican que el RNA de la cepa *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 tuvo un elevado grado de calidad y pureza. En la Figura 2.1 se muestran las bandas esperadas de 23S y 16S, la presencia y relación de las dos bandas en el gel de agarosa indica que el RNA no estaba degradado.

**Tabla 2.2.** Concentraciones e integridad del RNA total de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3.

No.	ID muestra	Concentración Ácidos nucleicos (ng/ $\mu$ L)	260/280
1	Bz R1 PM T0	2.27	2.05
2	Bz R2 PM T0	1.98	2.05
3	Bz R3 PM T0	2.18	2.05
4	Bz R1 SP T0	2.20	2.01
5	Bz R2 SP T0	2.69	2.04
6	Bz R3 SP T0	2.06	2.02
7	Bz R1 PM T3	1.70	2.01
8	Bz R2 PM T3	1.52	2.00
9	Bz R3 PM T3	1.10	1.98
10	Bz R1 SP T3	0.91	1.97
11	Bz R2 SP T3	1.02	1.99
12	Bz R3 SP T3	0.74	2.01
13	Bz R1 PM T9	1.19	2.00
14	Bz R2 PM T9	1.21	2.01
15	Bz R3 PM T9	1.39	2.03
16	Bz R1 SP T9	1.34	2.00
17	Bz R2 SP T9	3.24	2.00
18	Bz R3 SP T9	0.97	1.90

*Burkholderia zhejiangensis* (Bz), PM=Paratión Metílico, SP=Sin Paratión Metílico, R=No. de réplica, T=Tiempo de colecta.



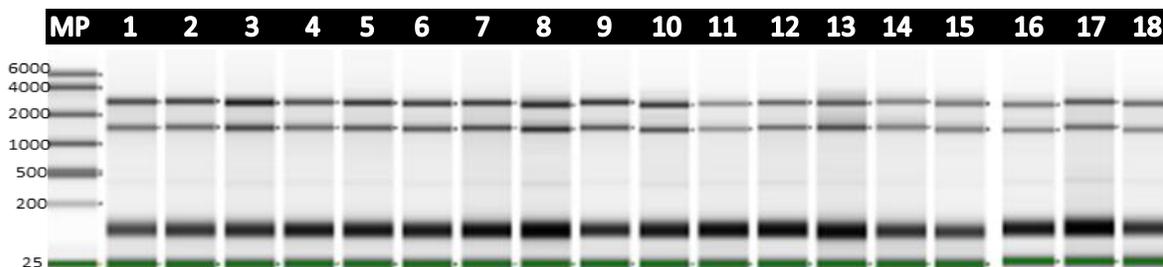
**Figura 2.1.** Electroforesis de RNA total de la cepa de *B. zhejiangensis* CEIB S4-3, carriles 1-3 y del 8-10 sin PM, réplicas 1, 2 y 3, carriles 4-6 y 11-13 con PM, réplicas 1, 2 y 3. Los carriles del 1-6 corresponden al tiempo 0 y del 8-13 son del tiempo 3 horas. Se utilizó buffer TBE 0.5X y se cargaron 2  $\mu$ L de cada muestra.

Asimismo, la empresa de GENEWIZ obtuvo los resultados de concentración y calidad de RNA, los cuales también se integran en la tabla 2.3 y en la figura 2.2. Las 18 muestras cubren con los requerimientos solicitados RIN >6, relación 260/280 >1.9 y concentración ng/ $\mu$ L >50.

**Tabla 2.3.** Concentración e integridad de los 18 RNA´s de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3.

No.	ID muestra	Concentración Ácidos nucleicos (ng/ $\mu$ L)	260/280	260/230	RIN
1	Bz R1 PM T0	3,175.2	1.98	2.32	9.0
2	Bz R2 PM T0	4,627.8	1.95	2.28	9.0
3	Bz R3 PM T0	5,300.1	2.02	2.25	9.4
4	Bz R1 SP T0	5,000.4	2.00	2.34	9.0
5	Bz R2 SP T0	5,759.1	2.09	1.55	9.1
6	Bz R3 SP T0	5,921.1	2.03	2.31	9.4
7	Bz R1 PM T3	5,756.4	2.02	2.05	9.0
8	Bz R2 PM T3	8,032.5	2.08	2.15	9.5
9	Bz R3 PM T3	5,481.0	2.02	2.34	9.5
10	Bz R1 SP T3	6,855.3	2.04	2.26	9.4
11	Bz R2 SP T3	5,243.4	2.02	2.06	8.5
12	Bz R3 SP T3	3,315.6	1.98	1.96	8.7
13	Bz R1 PM T9	5,043.6	2.07	1.14	9.3
14	Bz R2 PM T9	7,564.5	2.02	1.83	8.8
15	Bz R3 PM T9	4,881.6	2.04	1.79	9.1
16	Bz R1 SP T9	5,653.8	2.05	2.19	9.1
17	Bz R2 SP T9	4,050.0	2.08	1.52	8.7
18	Bz R3 SP T9	5,580.9	2.03	1.28	9.0

*Burkholderia zhejiangensis* (Bz), PM=Paratión Metílico, SP=Sin Paratión Metílico, R=No. de réplica, T=Tiempo de colecta.



**Figura 2.2.** Imagen representativa de las 18 muestras de RNA de la cepa de *B. zhejiangensis* CEIB S4-3, analizadas por “RNA ScreenTape” de Agilent, carril 1=Marcador de peso de 6 kb, carriles 1-3 con PM, 4-6 sin PM del tiempo 0, del carril 7-9 con PM, 10-12 sin PM del tiempo 3 y del carril 13-15 con PM y del 16-18 sin PM del tiempo 9.

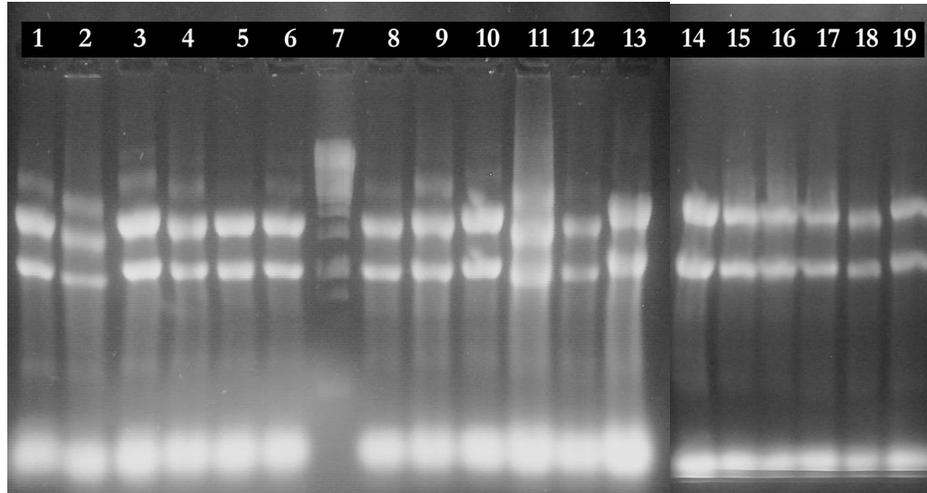
#### 2.4.2. Limpieza de muestras de RNA con DNAsa

De cada una de las 18 muestras de RNA se tomaron 30  $\mu\text{g}$  para eliminar el DNA presente en las muestras, se utilizó DNase I de Thermo Scientific e inmediatamente el RNA se limpió utilizando las columnas “RNA Clean and Concentrator” de la marca Zymo Research; al final del tratamiento se tomó una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra de las 18 muestras para determinar la concentración utilizando un nanodrop (Tabla 2.4) y revisar la integridad de los RNAs obtenidos mediante electroforesis (el RNA del tubo de colecta se guardó inmediatamente en un ultracongelador a  $-70^{\circ}\text{C}$ ) (Figura 2.3). Las lecturas en nanodrop demostraron una concentración final que osciló entre los 175 a 2,215  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , mientras que la empresa GENEWIZ solicitó la concentración mínima de  $\geq 50\text{ng}$ . A pesar de contar con la réplica dos del tiempo nueve horas con una concentración de 175  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , fue suficiente para ser analizada.

**Tabla 2.4.** Concentraciones e integridad del RNA total de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3, posterior al tratamiento con DNAsa.

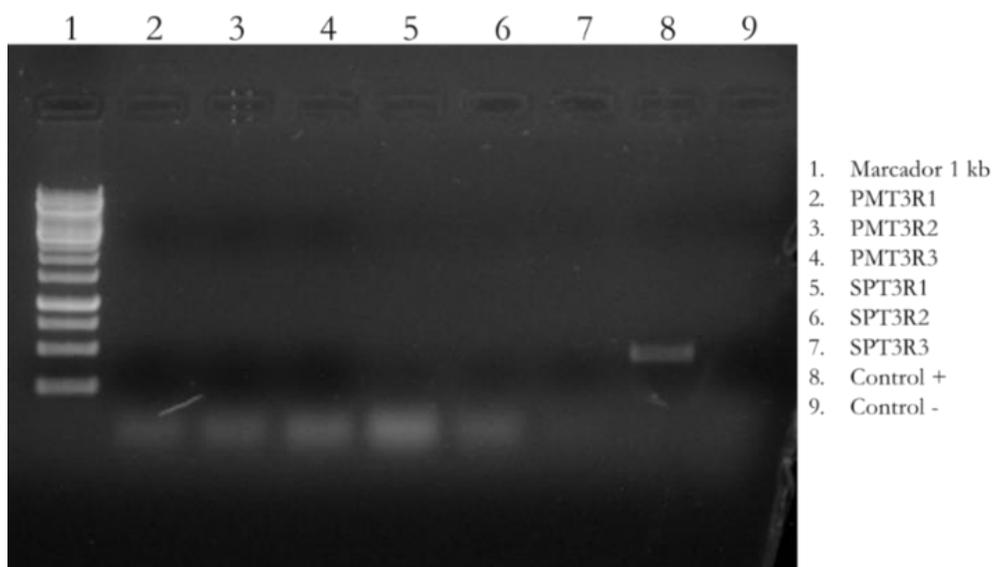
No.	ID muestra	Concentración Ácidos nucleicos (ng/ $\mu$ L)	260/280
1	Bz R1 PM T0	1,727.1	2.24
2	Bz R2 PM T0	930.4	2.09
3	Bz R3 PM T0	1,283.1	2.07
4	Bz R1 SP T0	949.3	2.08
5	Bz R2 SP T0	1,037.4	2.05
6	Bz R3 SP T0	758.4	1.74
7	Bz R1 PM T3	748.3	2.06
8	Bz R2 PM T3	1,316.8	2.12
9	Bz R3 PM T3	1,208.9	2.08
10	Bz R1 SP T3	2,171.8	2.10
11	Bz R2 SP T3	782.3	2.05
12	Bz R3 SP T3	2,215.0	2.11
13	Bz R1 PM T9	1,024.6	2.13
14	Bz R2 PM T9	812.7	2.09
15	Bz R3 PM T9	750.7	2.10
16	Bz R1 SP T9	600.4	2.04
17	Bz R2 SP T9	175.5	2.09
18	Bz R3 SP T9	824.6	2.10

*Burkholderia zhejiangensis* (Bz), PM=Paratión Metílico, SP=Sin Paratión Metílico, R=No. de réplica, T=Tiempo de colecta.



**Figura 2.3.** Electroforesis de RNA total de la cepa de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3, carriles 1-3 con PM, 4-6 sin PM del tiempo 0, el carril 7 es el marcador de 1 Kb, del carril 8-10 con PM, 11-13 sin PM del tiempo 3 y del carril 14-16 con PM y del 17-19 sin PM del tiempo 9. Se utilizó buffer TBE 0.5X y se cargaron 1.5  $\mu$ L de cada muestra.

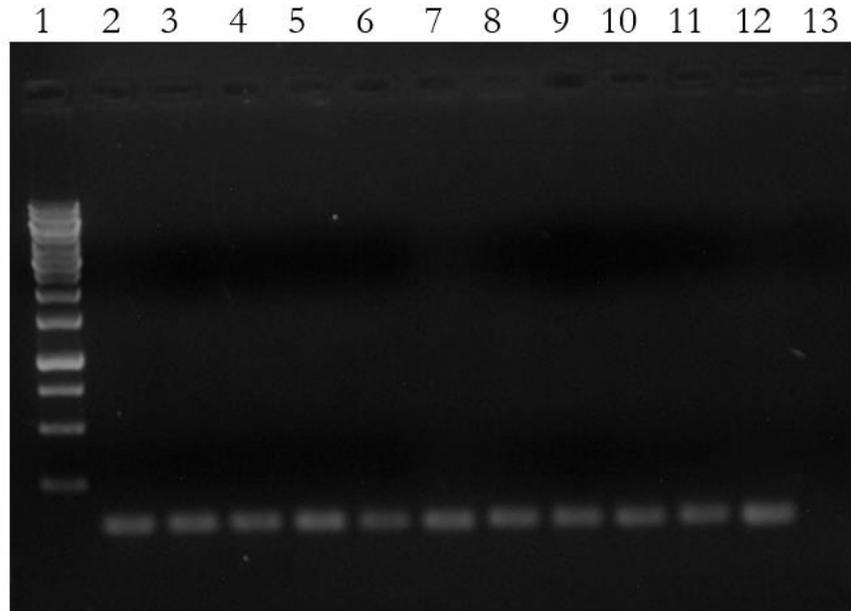
Para verificar que los RNA's estuvieran libres de DNA, de cada una de las 18 muestras de RNA tratado con DNAsa, se tomaron 0.5  $\mu$ L para realizar una reacción de PCR; el tamaño del fragmento esperado era de 500 pb. Como control positivo se utilizó el templado DNA genómico de la bacteria (alrededor de 5 ng) y como control negativo, la reacción sin templado. En la Figura 2.4 solo se representa el tiempo tres horas.



**Figura 2.4.** Electroforesis de DNA para verificar el resultado del tratamiento con DNAsa, de los carriles 2 al 7 se utilizó como templado 0.5  $\mu$ L de RNA del tiempo tres horas, el carril 8 es el control positivo utilizando de templado DNA genómico de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y el control negativo es la reacción sin el templado. PM=Paratión Metílico, SP=Sin Paratión, T=tiempo de colecta y R=No de réplica. Se utilizó buffer TAE al 1X y 5  $\mu$ L de cada muestra.

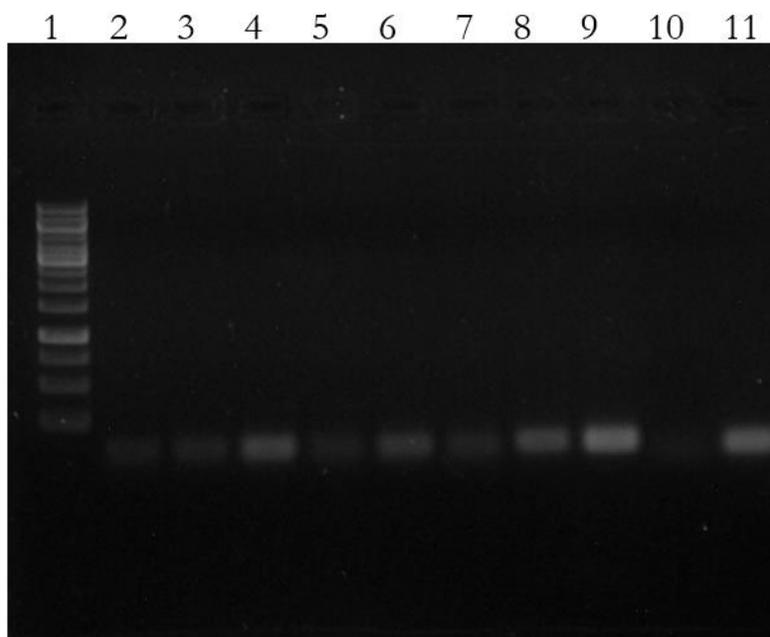
### 2.4.3. RT-PCR del gen *mpd* y *pnpC*

Adicionalmente, para evaluar los genes *recA*, el gen *mpd* involucrado en la hidrólisis del PM y en la ruta de degradación del PNF el gen *pnpC* se realizó RT-PCR. En la figura 2.5 se muestra la electroforesis de DNA del gen *mpd* en el cual no se observa diferencia de expresión en presencia o ausencia del PM.



**Figura 2.5.** RT-PCR punto final del gen *mpd*. Carril 1 Marcador de peso de 1 kb (1.5  $\mu$ L); Carril 2: PMT0R2 (0.5  $\mu$ L); Carril 3: SPT0R2 (0.5  $\mu$ L); Carril 4: PMT3R3 (0.5  $\mu$ L); Carril 5: SPT3R3 (0.5  $\mu$ L); Carril 6: PMT9R3 (0.5  $\mu$ L); Carril 7: SPT9R3 (0.5  $\mu$ L); Carril 8: *RecAPM* (0.5  $\mu$ L); Carril 9: *RecASP* (0.5  $\mu$ L); Carril 10: *RecAPM* (1  $\mu$ L); Carril 11: *RecASP* (1  $\mu$ L); Carril 12: Control positivo (DNA de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3) y el Carril 13: Control negativo (Agua). PM=Paratión Metílico, SP=Sin Paratión Metílico, T=Tiempo de colecta y R=No. de réplica. Se utilizó buffer TAE 1X.

Sin embargo, no pasa lo mismo con el gen *pnpC* se observa una banda más abundante en presencia de PM; no obstante, aún observamos una diferencia basal en la condición de ausencia de PM (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** RT-PCR punto final del gen *pnpC*. Carril 1 Marcador de peso de 1 kb (1.5  $\mu$ L); Carril 2: PMT0R2 (0.5  $\mu$ L); Carril 3: SPT0R2 (0.5  $\mu$ L); Carril 4: PMT3R3 (0.5  $\mu$ L); Carril 5: SPT3R3 (0.5  $\mu$ L); Carril 6: PMT9R3 (0.5  $\mu$ L); Carril 7: SPT9R3 (0.5  $\mu$ L); Carril 8: *RecASPT9R3* (0.5  $\mu$ L); Carril 9: *RecAPMT9R3* (0.5  $\mu$ L); Carril 10: Control negativo (Agua); Carril 10: Control positivo (DNA de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3). PM=Paratión Metílico, SP=Sin Paratión Metílico, T=Tiempo de colecta y R=No. de réplica. Se utilizó buffer TAE 1X.

*B. zhejiangensis* CEIB S4-3 presenta dos diferentes grupos de genes PNP's el *pnpABA'E1E2FDC* y el *pnpE1E2FDC* (Hernández-Mendoza *et al.*, 2014) involucrados en la degradación del PNP. Un grupo se localiza en el conting 4 y el otro en el 33, a diferencia de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 la cual presenta un solo grupo de genes catabólicos *pnpABA'E1E2FDC* (Martínez-Ocampo, 2016).

## 2.4.4. Secuenciación por Illumina HiSeq

En la tabla 2.5 se muestran los datos obtenidos de la secuenciación de la cepa *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 mediante una corrida de tipo Paired-End (lecturas dobles o pareadas) al utilizar el secuenciador HiSeq de la compañía Illumina, la cual muestra la secuencia del código de barras utilizado en la amplificación por puente, el número de lecturas obtenidas por muestra oscila entre ~19 a 44 millones, el rendimiento en mega pares de bases el cual se encuentra entre ~6 a 13 mil, la calificación de calidad media que se encuentran entre ~39 y el porcentaje de bases el cual se encuentra en ~95%, lo cual nos demuestra una buena calidad de las secuencias obtenidas.

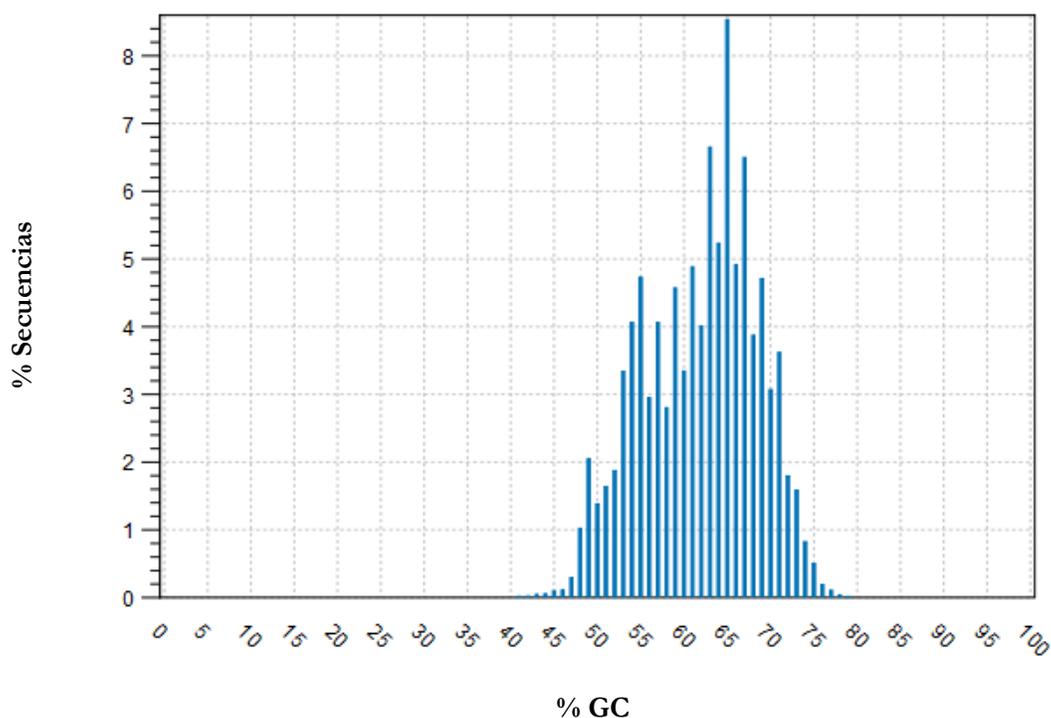
**Tabla 2.5.** Descripción general de la calidad de las secuencias.

No.	ID muestra	Secuencia de código de barras	Número de lecturas	Rendimiento (Mbases)	Calificación de calidad media	% Bases $\geq 30$
1	Bz R1 PM T0	ATCACG	32,727,484	9,884	39.0	94.4
2	Bz R2 PM T0	CGATGT	44,315,149	13,383	39.0	94.4
3	Bz R3 PM T0	TTAGGC	32,701,862	9,876	38.8	93.9
4	Bz R1 SP T0	TGACCA	23,551,869	7,113	38.9	94.2
5	Bz R2 SP T0	ACAGTG	20,531,941	6,201	39.0	94.3
6	Bz R3 SP T0	GCCAAT	28,541,303	8,619	39.0	94.3
7	Bz R1 PM T3	CAGATC	19,956,792	6,027	39.1	94.7
8	Bz R2 PM T3	ACTTGA	31,320,438	9,459	38.9	94.2
9	Bz R3 PM T3	GATCAG	28,816,751	8,703	39.0	94.4
10	Bz R1 SP T3	TAGCIT	25,832,456	7,801	38.9	94.1
11	Bz R2 SP T3	GGCTAC	21,410,193	6,466	39.0	94.4
12	Bz R3 SP T3	CTTGTA	29,805,494	9,001	38.8	93.9
13	Bz R1 PM T9	AGTCAA	20,547,696	6,205	39.0	94.3
14	Bz R2 PM T9	AGTTCC	27,443,606	8,288	39.0	94.5
15	Bz R3 PM T9	ATGTCA	25,615,014	7,736	39.0	94.3
16	Bz R1 SP T9	CCGTCC	30,863,887	9,321	39.0	94.5
17	Bz R2 SP T9	GTCCGC	30,859,762	9,320	39.0	94.4
18	Bz R3 SP T9	GTGAAA	31,852,805	9,620	39.0	94.3

*Burkholderia zhejiangensis* (Bz), PM=Paratión Metílico, SP=Sin Paratión Metílico, R=No. de réplica, T=Tiempo de colecta.

## 2.4.5. Contenido de GC de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3

La figura 2.7 muestra el porcentaje de nucleótidos de las lecturas, lo cual indica que el genoma de *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 presenta un contenido de GC promedio de ~65% y no existe contaminación de otro material genómico. Esto coincide con lo reportado por Martínez-Ocampo (2015), donde menciona que el porcentaje de GC de esta cepa se encuentra en ~63%.



**Figura 2.7.** Contenido promedio de GC por secuencia.

## 2.4.6. Mapeo de las secuencias de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3

Posteriormente, se realizó el mapeo de las secuencias con el genoma de referencia. Las lecturas de secuencias fueron recortadas para eliminar posibles secuencias de adaptadores y nucleótidos de mala calidad (tasa de errores  $<0.05$ ) al final. Después de recortar, se descartaron las lecturas de

secuencias más cortas que 35 nucleótidos. Las lecturas de secuencias restantes se alinearon con el genoma de referencia de *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 con el programa CLC Genomics Server program v. 10.0.1. En la tabla 2.6 se muestran las estadísticas del mapeo.

**Tabla 2.6.** Número de fragmentos totales, mapeados y no mapeados con el genoma de referencia *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3.

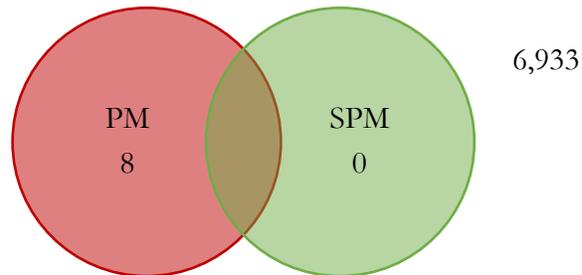
No.	ID muestra	Fragmentos totales	Fragmentos mapeados	Fragmentos no mapeados	Fragmentos sobre el total (%)
1	Bz R1 PM T0	32,643,774	27,748,262	4,895,512	85.0
2	Bz R2 PM T0	44,265,153	39,113,650	5,151,503	88.4
3	Bz R3 PM T0	32,662,464	27,989,409	4,673,055	85.7
4	Bz R1 SP T0	23,531,603	18,442,661	5,088,942	78.4
5	Bz R2 SP T0	20,507,262	17,191,298	3,315,964	83.8
6	Bz R3 SP T0	28,488,233	23,843,014	4,645,219	83.7
7	Bz R1 PM T3	19,905,111	17,563,748	2,341,363	88.2
8	Bz R2 PM T3	31,233,051	25,664,847	5,568,204	82.2
9	Bz R3 PM T3	28,718,690	24,103,989	4,614,701	83.9
10	Bz R1 SP T3	25,781,879	21,055,362	4,726,517	81.7
11	Bz R2 SP T3	21,377,341	18,858,954	2,518,387	88.2
12	Bz R3 SP T3	29,749,398	24,190,584	5,558,814	81.3
13	Bz R1 PM T9	20,500,030	17,427,529	3,072,501	85.0
14	Bz R2 PM T9	27,381,708	24,015,237	3,366,471	87.7
15	Bz R3 PM T9	25,548,945	23,111,906	2,437,039	90.5
16	Bz R1 SP T9	30,820,624	27,302,321	3,518,303	88.6
17	Bz R2 SP T9	30,830,107	26,722,055	4,108,052	86.7
18	Bz R3 SP T9	31,814,350	26,234,514	5,579,836	82.5

*Burkholderia zhejiangensis* (Bz), PM=Paratión Metílico, SP=Sin Paratión Metílico, R=No. de réplica, T=Tiempo de colecta.

## 2.4.7. Expresión diferencial de genes de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3

Como resultado del análisis transcriptómico de ambas condiciones, con 50 mg/L de PM y sin la presencia del plaguicida, se observaron un total de 6,941 transcritos para el inicio del experimento, a las tres horas se obtuvieron un número de 6,810 y finalmente a las nueve horas 6,741 transcritos. El número total de genes es de 7096 genes codificantes y 75 no codificantes (tRNAs, RNAs ribosomales, entre otros). Para identificar los Genes Expresados Diferencialmente (GED) en cada una de las condiciones, se realizó un análisis con el programa DESeq2 y tomando los genes con un valor de veces de cambio  $\pm 1.5$  y un valor de  $p < 0.05$ , en el tiempo cero horas sin PM no se obtuvo ningún GED, respecto al tiempo de tres horas se obtuvieron 278 GED, mientras que en el tiempo de nueve horas se obtuvieron 823 genes. Las veces de cambio de la condición experimental con PM reveló la expresión diferencial de ocho genes al inicio de la cinética (cero horas), en el tiempo de tres horas fueron identificados 376 GED y finalmente, en el tiempo de nueve horas, se detectaron 756 genes. En la figura 2.8 se muestra la distribución de GED por DESeq de acuerdo a cada tiempo y condición experimental.

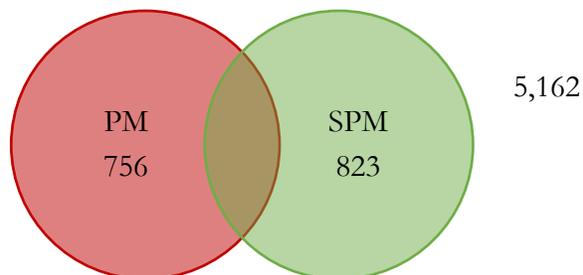
T0



T3

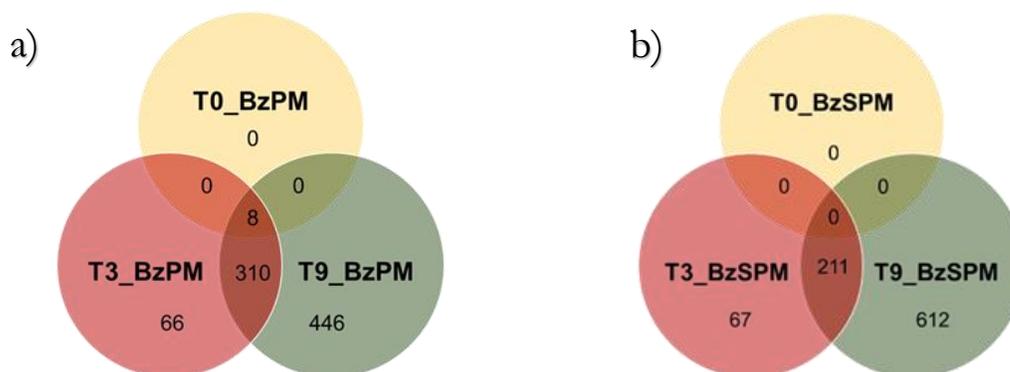


T9



**Figura 2.8.** Diagrama de Venn total de genes expresados en ambas condiciones con Paratión Metílico (PM) y sin PM (SPM). Se muestra la distribución de GED por DESeq de acuerdo a cada tiempo (tiempo cero (T0), tres (T3) y nueve (T9) horas) y condición experimental, en rojo PM y en verde SPM.

De los GED, 318 se compartieron en presencia de PM, entre los tres tiempos, de los cuales ocho corresponden a los GED del tiempo de cero horas y 310 genes se compartieron entre en el tiempo tres y nueve horas. En la condición control sin PM se compartieron 211 genes entre el tiempo tres y nueve horas, no se reportaron GED compartidos entre los tres tiempos debido a que no se observó ningún GED en el tiempo de cero horas. Además, no se compartieron GED entre la condición con PM y sin PM en los tres tiempos, lo que sugiere que la cepa *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 responde de manera diferente al estrés ejercido por cada condición (Figura 2.9).



**Figura 2.9.** Diagrama de Venn con genes expresados diferencialmente compartidos por condición entre los tres tiempos. a) Genes expresados en presencia de PM y b) Genes expresados en ausencia de PM. Bz= *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3, PM=Paratión Metílico y SPM=Sin Paratión Metílico.

Los ocho GED en la condición experimental con PM y al inicio de la cinética fueron los siguientes: un *transportador*; dos *proteínas de función desconocida*; una *permeasa*; dos *proteínas hipotéticas*; un *regulador transcripcional Múltiples de la Resistencia a los Antibióticos (MarR)*. En general, los homólogos de MarR regulan la actividad de genes implicados en la resistencia a antibióticos, respuestas de estrés, virulencia o catabolismo de compuestos aromáticos (Perera y Grove, 2010); un *regulador transcripcional (IcR)*, los miembros de esta familia son represores del gen isocitrato liasa (Romero-Rodríguez *et al.*, 2015), sus funciones son diversas, algunas de ellas son el metabolismo del carbono en Enterobacteriaceas, degradación de compuestos aromáticos por

bacterias del suelo, tolerancia a disolventes en *Pseudomonas* (Krell *et al.*, 2006). Además, de dos proteínas hipotéticas las cuales fueron analizadas en Blast, pero no se encontró ninguna proteína reportada para estas secuencias.

De los GED en la condición con PM se observó la inducción de varias proteínas hipotéticas y proteínas de función desconocida, representando el 50% para el tiempo inicial (cero horas), el 20% y 15% para el tiempo tres y nueve horas respectivamente. En la condición sin PM se observó la inducción de este tipo de genes, representando el 33 y 36% en el tiempo tres y nueve horas respectivamente. Chen *et al.* (2016) reportan el análisis transcriptómico de *Pseudomonas putida* DLL-E4 en presencia de PNF, en la cual encontraron que el grupo más grande de genes correspondía a proteínas hipotéticas y proteínas con función desconocida.

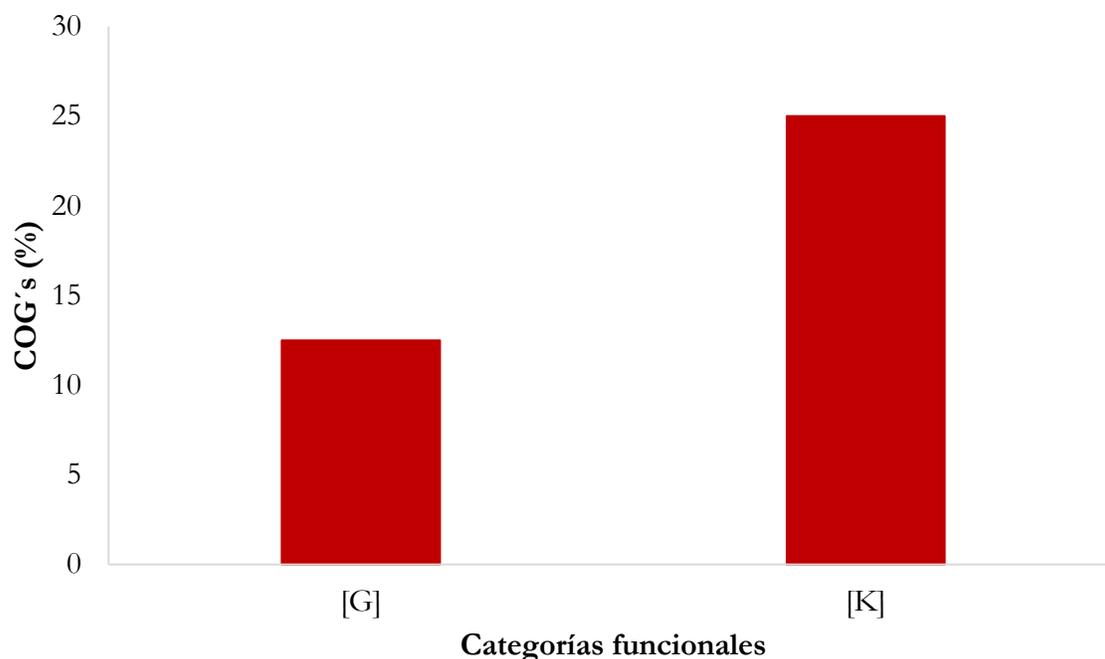
Además, en la condición con PM se observó una inducción de genes involucrados en la regulación transcripcional con dos elementos para el tiempo de cero horas representando el 25%, 29 elementos para el tiempo de tres horas (8%) y 41 elementos en el tiempo de nueve horas (5%). Chen *et al.* (2016) mencionan que múltiples componentes que incluyen reguladores transcripcionales y otros factores desconocidos regulan la degradación de PNF en *Pseudomonas putida* DLL-E4, como el regulador transcripcional tipo LysR (LTTR) el cual activa la expresión de genes en respuesta al inductor específico PNF. Además, Wang *et al.* (2017) menciona que un LTTR, PnpR, se ha demostrado que activa la transcripción de los operones *pnpABCDEF*G para la degradación de PNP en *Pseudomonas* sp. cepa WBC-3. Este regulador también se encuentra en la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 y se observa una sobreexpresión de este regulador en la condición con PM. Los LTTR se encuentran en diversos generos bacterianos. Están asociados con la regulación de las vías de degradación de los compuestos aromáticos y controlan la expresión génica del catecol (CatR) y Clorocatecol (ClcR y CbnR) (Díaz y Prieto, 2000; Tropel y Van Der Meer, 2004).

Asimismo, se observó en este trabajo la sobreexpresión de otras familias de reguladores transcripcionales, como GntR, AraC y MerR, en presencia del plaguicida. Los reguladores transcripcionales de la familia GntR están ampliamente distribuidos en las bacterias. Regulan diversos procesos biológicos, incluidos los procesos celulares fundamentales como la motilidad, el desarrollo, la producción y resistencia a antibióticos, la transferencia de plásmidos, la virulencia y la degradación de los compuestos aromáticos (Díaz y Prieto, 2000; Tropel y Van Der Meer, 2004; Hoskisson y Rigali, 2009). El miembro de la familia de reguladores transcripcionales de AraC mejor caracterizado en el catabolismo de compuestos aromáticos es la proteína XylS. Esta proteína regula positivamente el promotor *P<sub>m</sub>*, que se deriva de la expresión de la vía de escisión meta TOL para compuestos aromáticos (Díaz y Prieto, 2000). Finalmente, la familia MerR es un grupo de activadores transcripcionales, que responden a estímulos ambientales, como el estrés oxidativo, los metales pesados o la presencia de antibióticos (Brown *et al.*, 2003).

Otro estudio es el de Tiwari *et al.* (2018), en el cual reportan la estrategia de tolerancia y degradación del plaguicida PM de la cianobacteria *Fischerella* sp., el cual se llevó a cabo a través de un análisis proteómico utilizando la técnica 2D acoplada con MALDI-TOF MS/MS, además de un análisis transcriptómico a través de RT-PCR. El estudio mostró algunas proteínas hipotéticas reguladas positivamente en *Fischerella* sp., en presencia del plaguicida. Se menciona que un sistema regulatorio de dos componentes transmite la señal a una proteína hipotética, que manera directa o indirecta, esta proteína posiblemente funge como factor de transcripción, por lo que se proponen que pudiera estar induciendo diferentes proteínas de respuesta al estrés, junto con la inducción de otra proteína hipotética, una probable hidrolasa que presenta una capacidad de unión a carbohidratos y a su afinidad con el PM. Por lo tanto, sugieren que esta proteína podría tener un papel crucial en la degradación del plaguicida.

## 2.4.8. Anotación funcional por COG's

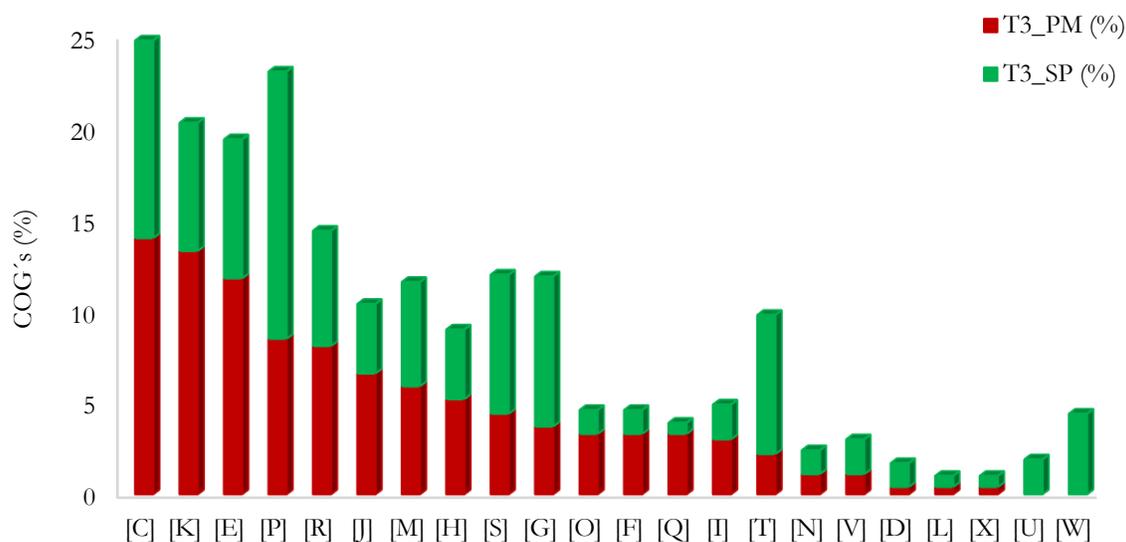
Con la finalidad de identificar si los genes GED participan en diversas funciones o bien si estos se distribuyen en un reducido número de categorías analizamos la distribución de los GED. Para ello, los GED se clasificaron de acuerdo con las categorías funcionales de grupos de ortólogos de genes (COG) (Galperin *et al.*, 2014). En el tiempo cero, en la condición experimental en presencia de PM, se observaron tres genes GED, dos de ellos agrupados en la categoría funcional [K]: transcripción y uno en la categoría [G]: transporte y metabolismo de carbohidratos, cada una representando el 12.5%, de los cuales representan el 38% de los GED, mientras que el 62% no se agrupó en ninguna categoría (Figura 2.10). No se reportaron GED para el tiempo cero horas en la condición sin PM, por lo cual no se cuenta con COG's para esta condición.



**Figura 2.10.** Categorías funcionales del tiempo cero horas en presencia de paratión metílico.

Después de tres horas, la condición experimental MSM sin PM mostró un conjunto de 278 GED de los cuales 158 genes se agruparon en 22 COG's representando el 56.8%, y 120 elementos no se agruparon en ninguna categoría representando el 43.2%. Las cinco categorías principales, de acuerdo con el número de genes GED, fueron [P]: transporte y metabolismo de iones inorgánicos con 23 elementos (14.6%), 17 elementos de la categoría [C]: producción y conversión de energía (10.8%), 13 elementos de la [G]: transporte y metabolismo de carbohidratos representando el 8.2%, 12 elementos de la categoría [I]: mecanismos de transducción de señales (7.6%) y 12 genes sin función asignada [S] representando el 7.6%.

En el mismo tiempo, en la condición experimental con MP, se encontraron 376 GED. De estos 271 GED se agrupan en 20 COG's, lo que representa el 72.3% y 104 elementos no se agruparon en ninguna categoría representado el 27.7%. Las categorías sobrerrepresentadas fueron [C]: producción y conversión de energía con 38 elementos corresponde al 14.0%, 36 elementos para la categoría [K]: transcripción (13.3%), 32 elementos para [E]: transporte y metabolismo de aminoácidos (11.8%), 23 elementos para [P]: transporte y metabolismo de iones inorgánicos (8.5%), 22 genes con solo predicción de función general [R] representando el 8.1% (Figura 2.11).

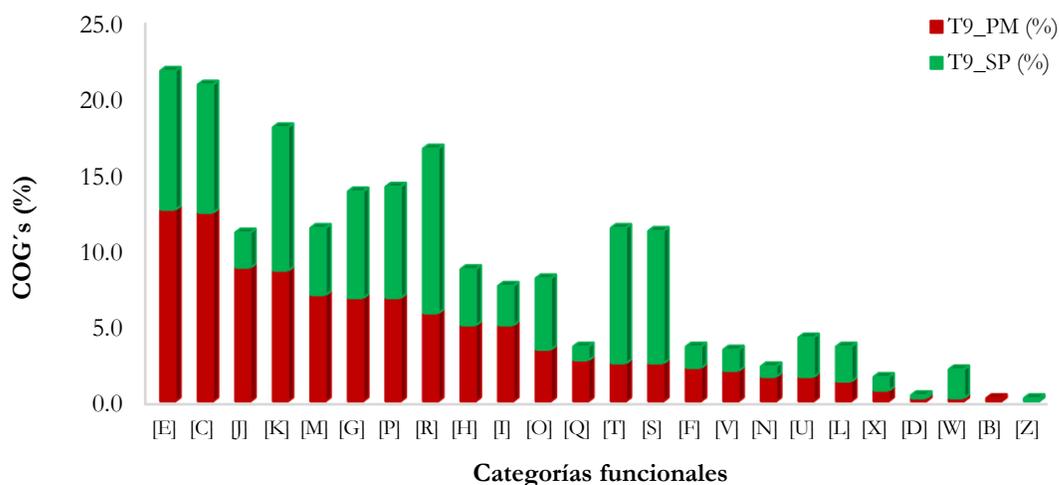


**Categorías funcionales**

**Figura 2.11.** Categorías funcionales del tiempo tres horas en presencia y ausencia de paratión metílico. T3= Tiempo de muestreo a las tres horas, PM= Paratión metílico y SP= Sin paratión metílico.

Como se muestra en la figura 2.12, en un tiempo de nueve horas la condición experimental MSM sin PM, de los 823 GED mostró un subconjunto de 427 genes agrupados en 23 COG's representando el 51.9%, y el 48.1% con 396 elementos no se agruparon en ninguna categoría. Las cinco categorías principales, según el número de genes con perfiles transcripcionales diferenciales, se encontraron 46 genes con solo una función de predicción general [R] representando el 10.8%, 40 elementos para la categoría [K]: transcripción (9.4%), 39 elementos para [E]: transporte y metabolismo de aminoácidos (9.1%), 38 elementos para [T]: mecanismos de transducción de señales, representando el 8.9% y 37 genes sin función asignada [S] representando con el 8.7%.

La condición con PM al mismo tiempo, se encontraron 756 GED donde 556 genes son agrupados en 23 COG representado el 73.5%, el resto corresponde al 26.5% con 200 elementos que no se agruparon en ninguna categoría. Las cinco categorías principales, siguiendo los mismos criterios, fueron con 70 elementos la categoría [E]: transporte y metabolismo de aminoácidos (12.6%), 69 elementos para [C]: producción de energía y conversión (12.4%), 49 elementos para [J]: traducción, estructura ribosomal y biogénesis (8.8%), 48 elementos para [K]: transcripción representando el 8.6% y 39 elementos para [M]: biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana (7.0%). La categoría [B] denominada estructura y dinámica de la proteína solo fue encontrada en esta condición representada con un elemento (0.2%).



**Figura 2.12.** Categorías funcionales del tiempo nueve horas en presencia y ausencia de paratión metílico. T9= Tiempo de muestreo a las nueve horas, PM= Paratión metílico y SP= Sin paratión metílico.

En la tabla 2.7 se muestran las cinco principales categorías funcionales en los tres tiempos a las cero, tres y nueve horas, así como en las dos condiciones experimentales con y sin PM, en la cual se observa un mayor número de GED en el tiempo de nueve horas comparado con el tiempo

ceros y tres horas. Además, en los tres tiempos con PM se comparte la categoría funcional [K] de transcripción; en el tiempo tres y nueve horas se comparten las categorías funcionales [C] de producción y conversión de energía y [E] de transporte y metabolismo de aminoácidos. Sin embargo en la condición sin PM las categorías funcionales que se comparten son [S] sin función asignada y [I] mecanismo de transducción de señales.

**Tabla 2.7.** Resumen de los resultados de las categorías funcionales.

Tiempo de muestreo y tratamiento	Principales categorías (COG)	Definición	No. GED	%
<b>Cero horas, sin PM</b>	--	--	-	-
<b>Cero horas, con PM</b>	[K]	Transcripción	2	25.0
	[G]	Transporte y metabolismo de carbohidratos	1	12.5
<b>Tres, sin PM</b> Total =278 GED 158 agruparon en 22 COG´s (56.8%). 120 sin agruparse (43.2%)	[P]	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	23	14.6
	[C]	Producción y conversión de energía	17	10.8
	[G]	Transporte y metabolismo de carbohidratos	13	8.2
	[T]	Mecanismos de transducción de señales	12	7.6
	[S]	Sin función asignada	12	7.6
<b>Tres horas, con PM</b> Total =376 GED, 271 agruparon en 20 COG´s (72.3%). 104 sin agruparse (27.7%).	[C]	Producción y conversión de energía	38	14.0
	[K]	Transcripción	36	13.3
	[E]	Transporte y metabolismo de aminoácidos	32	11.8
	[P]	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	23	8.5
	[R]	Predicción de función general	22	8.1
<b>Nueve horas, sin PM</b> Total =823 GED, 427 agrupados en 23 COG´s (51.9%) 396 sin agruparse (48.1%)	[R]	Predicción general	46	10.8
	[K]	Transcripción	40	9.4
	[E]	Transporte y metabolismo de aminoácidos	39	9.1
	[T]	Mecanismos de transducción de señales	38	8.9
	[S]	Sin función asignada	37	8.7
<b>Nueve horas, con PM</b> Total =756 GED, 556 agrupados en 23 COG´s (73.5%); 200 sin agruparse (26.5%)	[E]	Transporte y metabolismo de aminoácidos	70	12.6
	[C]	Producción de energía y conversión	69	12.4
	[J]	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	49	8.8
	[K]	Transcripción	48	8.6
	[M]	Biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana	39	7.0

Las categorías funcionales [S] que corresponde a función desconocida y [R] a una función de predicción general y aquellos elementos que no se agruparon en ninguna categoría en la condición con PM, representan el 62% para el tiempo inicial (cero horas), el 40.2% para las tres horas y el 41.6% para las nueve horas. Sin embargo, para la condición control (en ausencia de PM), el 57.1% y el 65.9% de los GED corresponden a la categoría [S], [R] y aquellos elementos que no pertenecen a ningún COG, lo que sugiere que la cepa *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 puede utilizar procesos celulares que no han sido caracterizados todavía, a pesar de que los genes involucrados en la degradación tanto de PM y PNF han sido ampliamente estudiados. Esto coincide con lo reportado por Chen *et al.* (2016), en este estudio se analizaron los mecanismos de regulación genética durante la degradación de PNF en *Pseudomonas putida* DLL-E4, observando cambios importantes en la expresión de un gran número de genes correspondientes a proteínas hipotéticas y con función desconocida.

Liao *et al.* (2018) demostraron que *Citrobacter* sp. degrada el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), aunque el mecanismo de biodegradación es poco conocido. Muestran que tres grupos de proteínas reguladas hacia arriba y en la condición con TNT durante 12 horas estuvieron involucradas en la [C]: producción de energía y conversión (18%), en [E]: transporte y metabolismo de aminoácidos (18%), y en [O]: modificación postraducciona, recambio proteico y chaperonas (18%). Esto coincide con lo observado en la cepa *B. zhejiangensis* CEIB S4-3, en la condición con PM y en el tiempo tres y nueve horas, las proteínas reguladas hacia arriba son [C] con 38 y 69 elementos que representan el 14.0 y 12.4% respectivamente, [E] con 32 y 70 elementos representado con el 11.8 y 12.6% respectivamente y [O] con 9 y 19 elementos representando con el 3.3 y 3.4% respectivamente. Los xenobióticos como el PNF y el TNT inducen efectos tóxicos a las bacterias, incluyendo el estrés oxidativo o daño a las proteínas, sin embargo, conocer el mecanismo de biotransformación permite desarrollar estrategias de biorremediación para sitios contaminados.

## 2.4.9. Anotación funcional por Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

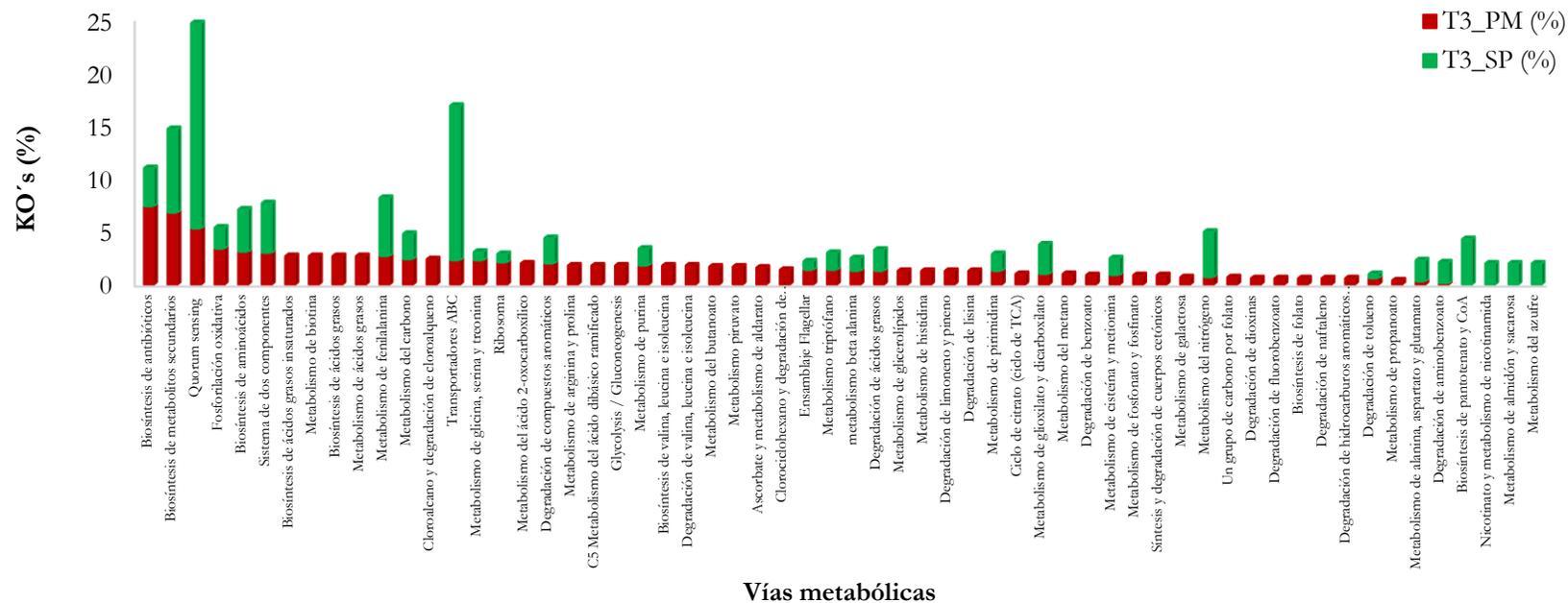
Los GED en los tres tiempos fueron analizados y ubicados en el mapa de KEGG, utilizando a *Burkholderia sp.* RPE67 con el código de organización “bue” como cepa de referencia. En el tiempo de cero horas y en la condición con PM el 12.5% de los GED presentaron KO’s, mientras que para el tiempo tres y nueve horas se presentaron 52.9% y 56.9%, respectivamente. Por otro lado, en la condición sin PM se presentaron 0% de KO’s en el tiempo de inicial, 38.1% en el tiempo de tres horas y 31.7% para el tiempo de nueve horas.

Los genes de las cero horas y en ambas condiciones (con PM y sin PM) no fueron ubicados en las vías metabólicas de KEGG.

Para el tiempo tres horas, las vías metabólicas únicas para la condición con PM fueron: 1. Biosíntesis de ácidos grasos insaturados; 2. Metabolismo de biotina; 3. Biosíntesis de ácidos grasos; 4. Metabolismo del ácido graso; 5. Cloroalcano y degradación de cloroalcano; 6. Metabolismo del 2-oxocarboxílico; 7. Metabolismo de arginina y prolina; 8. Metabolismo del ácido dibásico ramificado; 9. Glucolisis/Gluconeogénesis; 10. Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina; 11. Metabolismo del butanoato; 12. Metabolismo del piruvato; 13. Metabolismo del ascorbato y aldarato; 14. Clorociclohexano y degradación de clorobenceno; 15. Metabolismo de glicerolípidos; 16. Metabolismo de histidina; 17. Degradación de limoneno y pineno; 18. Degradación de lisina; 19. Ciclo del citrato (Ciclo de TCA); 20. Metabolismo del metano; 21. Degradación de benzoato; 22. Metabolismo de fosfonato y fosfinato; 23. Síntesis y degradación de cuerpos cetónicos; 24. Metabolismo de galactosa; 25. Un grupo de carbono por folato; 26. Degradación de dioxinas; 27. Degradación de fluorobenzoato; 28. Biosíntesis de folato; 29. Degradación de naftaleno; 30. Degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos; 31. Resistencia a  $\beta$ -lactámicos; 32. Metabolismo del ácido cianoamino; 33. Biosíntesis de novobiocina; 34. Metabolismo del propanoato; 35. Metabolismo de la taurina y la hipotaurina; 36. Quimiotaxis bacteriana; 37. Fijación de carbono en organismos fotosintéticos; 38. Vía de

pentosas fosfato; 39. Biosíntesis de la unidad de azúcar poliquétido; 40. Biosíntesis de estreptomina; 41. Ubiquinona y otras biosíntesis de terpenoides y quinonas; 42. Biosíntesis de lisina; 43. Porphirina y metabolismo de la clorofila; 44. Metabolismo de riboflavina y 45. ARN polimerasa.

En cambio, en la condición control (Sin PM) las vías metabólicas únicas fueron: 1. Biosíntesis de pantotenato y CoA; 2. Nicotinato y metabolismo de nicotinamida; 3. Metabolismo de almidón y sacarosa; 4. Metabolismo del azufre; 5. Unión final no homologa; 6. Metabolismo del amino azúcar y nucleótido azúcar; 7. Metabolismo del glicerofosfolípido; 8. Degradación de estireno; 9. Interconversiones de pentosas y gluconato y 10. Degradación de Xileno (Figura 2.13).



**Figura 2.13.** Distribución de los genes expresados diferencialmente de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 a las tres horas en KEGG. T3= Tiempo de muestreo a las tres horas, PM= Paratión metílico y SP= Sin paratión metílico.

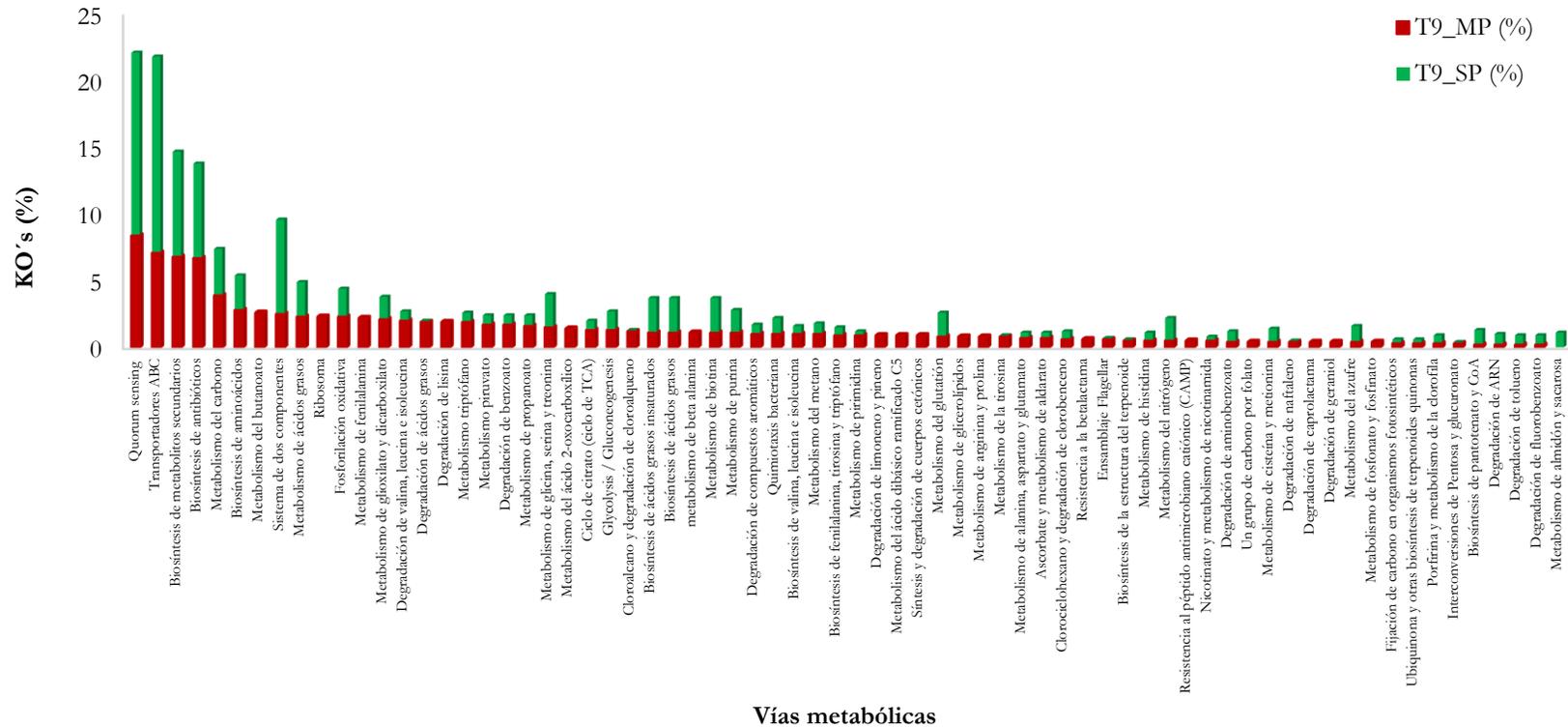
Por último, para el tiempo nueve horas las vías metabólicas únicas para la condición con PM fueron: 1. Metabolismo de butanoato; 2. Ribosoma; 3. Metabolismo de fenilalanina; 4. Degradación de lisina; 5. Metabolismo del ácido 2-oxocarboxílico; 6. Metabolismo de  $\beta$  alanina; 7. Degradación de limoneno y pineno; 8. Metabolismo del ácido dibásico ramificado C5; 9. Síntesis y degradación de cuerpos cetónicos; 10. Metabolismo de glicerolípidos; 11. Metabolismo de arginina y prolina; 12. Resistencia a la  $\beta$ -lactamasa; 13. Resistencia al péptido antimicrobiano catiónico (CAMP); 14. Un grupo de carbono por folato; 15. Degradación de coprolactámicos; 16. Degradación de geraniol; 17. Metabolismo de fosfonato y fosfinato; 18. Recombinación homóloga; 19. Degradación de dioxinas; 20. Metabolismo de la taurina y la hipotaurina; 21. Biosíntesis de novobiocina; 22. Metabolismo de riboflavina; 23. Metabolismo del ácido cianoamino; 24. ARN polimerasa; 25. Metabolismo del fosfato de inositol; 26. Biosíntesis de monobactámico; 27. Biosíntesis de estreptomina; 28. Biosíntesis de la unidad de azúcar poliéctido; 29. Metabolismo de tiamina; 30. Metabolismo del ácido alfa linoléico; 31. Biosíntesis de Lisina; 32. Metabolismo D-glutamina y D-glutamato y 33. Biosíntesis del ARNt de aminoácido.

En contraste, en la condición control (sin PM), las vías metabólicas fueron: 1. Metabolismo de almidón y sacarosa; 2. Unión final no homóloga; 3. Metabolismo del amino azúcar y nucleótido azúcar; 4. Reparación de escisión de base; 5. Reparación por escisión de nucleótidos y 6. Degradación de xileno (Figura 2.14).

En la condición con PM se inducen un mayor número de vías metabólicas con respecto a la condición control, lo que sugiere que la activación del metabolismo bacteriano se genera en respuesta a los efectos tóxicos derivados de la presencia del PNF y su asimilación metabólica como fuente de carbono y energía.

Chen *et al.*, (2016) reportan la capacidad de la cepa *Pseudomonas putida* DLL-E4 para degradar PNF a través de la ruta de la Hidroquinona (HQ). El PNF indujo un cambio global en el

transcriptoma de la cepa incluyendo cambios en el metabolismo del PNF; en el metabolismo de carbono; en el ciclo del ácido tricarboxílico; en la porina OprB de la membrana externa; en la Glucosa deshidrogenasa Gcd fueron significativamente sobreexpresadas cuando la cepa estaba en contacto con PNF y glucosa, en comparación con la condición sin glucosa. Mientras que los genes implicados en la vía de las pentosas fosfato se vieron reprimidos en presencia de PNF. Con la cepa *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 se observó que el metabolismo del carbono y el ciclo del ácido tricarboxílico se encuentran representados con 65 y 22 elementos respectivamente en el tiempo de nueve horas, los cuales fueron sobreexpresadas cuando la cepa está en contacto con PNF. Sin embargo, en la vía de las pentosas fosfato se encuentra reprimida representada con dos elementos, lo cual coincide con el reporte de Chen *et al.*, (2016).



**Figura 2.14.** Distribución de los genes expresados diferencialmente de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 a las nueve horas en KEGG. T9= Tiempo de muestreo a las nueve horas, PM= Paratión metílico y SP= Sin paratión metílico.

El reporte de Chakka *et al.* (2015) muestra el análisis transcripcional de *E. coli*, la cual expresa un marco de lectura abierto (Orf306) ubicado cerca del gen *oph* del plásmido pPDL2 de la cepa *Sphingobium fuliginis* ATCC 27551 y en presencia de PNF como única fuente de carbono. Este gen codifica para una hidrolasa de organofosforados. Esta expresión del Orf306 sobreexpresa genes que codifican para el catabolismo de carbono alternativo, el propionato, el glioxilato y el ciclo del metilcitrato. Además, muestran una significativa disminución en la transcripción de genes que codifican para la glucólisis y enzimas del ciclo del TCA poco después de la inducción de Orf306. De acuerdo con este reporte, el perfil transcripcional de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 demostró una sobreexpresión de la vía del propionato y el glioxilato en presencia de PM, esta sobreexpresión comienza a observarse hasta el tiempo de nueve horas. Sin embargo, con respecto a la glucólisis y al ciclo del TCA en *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 existe también una sobreexpresión de la glucólisis en la condición con PM en el tiempo de tres horas el cual incrementa en el tiempo de nueve horas. Mientras que el ciclo del TCA en la condición con PM comienza a observarse una sobreexpresión a partir del tiempo de nueve horas, lo cual no coincide con lo reportado por Chakka *et al.* (2015).

En el estudio de Lu *et al.* (2013) reportan el análisis de transcriptoma de *E. coli* expuesto a glifosato e incapaz de crecer en presencia de este herbicida organofosforado a 200 mM. Estos resultados sugieren que el herbicida inhibe varias enzimas clave del metabolismo central de carbono como la vía de pentosas fosfato, el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), glioxilato y la gluconeogénesis, lo cual reduce la capacidad glucolítica.

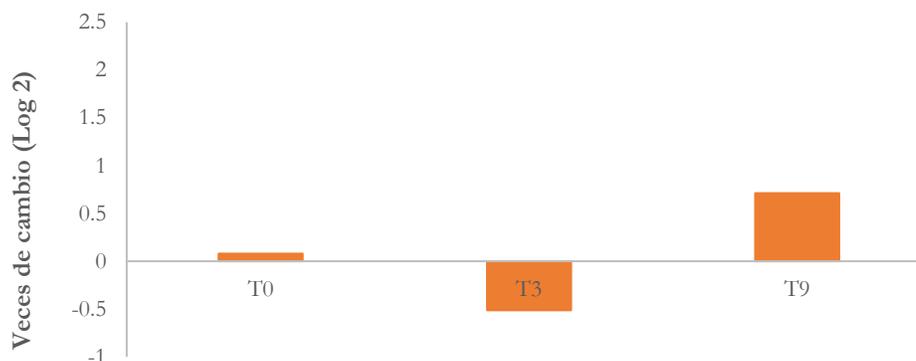
Como se mencionó anteriormente, en la vía de las pentosas fosfato se encuentra reprimida representada con dos elementos, lo cual coincide con el reporte de Chen *et al.* (2016) y con Lu *et al.* (2013). Asimismo, el ciclo del TCA en *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 en la condición con PM comienza a observarse una sobreexpresión a partir del tiempo de nueve horas. Para el caso de la vía del glioxilato a pesar de no estar sobrerrepresentada en los tiempos cero y tres horas en presencia de PM, esta sobreexpresión comienza a observarse hasta el tiempo de nueve horas de

exposición al plaguicida y al PNF. En el caso de la gluconeogénesis a pesar de que parece estar sobreexpresión en presencia de PM a las tres horas, sin embargo, a las nueve horas de exposición al plaguicida se observa una mejor sobreexpresión.

#### 2.4.10. Análisis del gen *mpd* involucrado en la hidrólisis de PM

Uno de los aspectos relevantes del proyecto es conocer cuáles son los genes involucrados en la completa mineralización del PM, para ello se realizó una búsqueda específica de estos genes y su perfil de expresión. El primer gen de la ruta de degradación es el *mpd*, el cual codifica para una metil paratión hidrolasa. Previamente en el laboratorio donde se lleva a cabo este proyecto, se caracterizó el gen *mpd* cuyo producto presenta actividad de hidrolasa (Popoca-Ursino *et al.*, 2017).

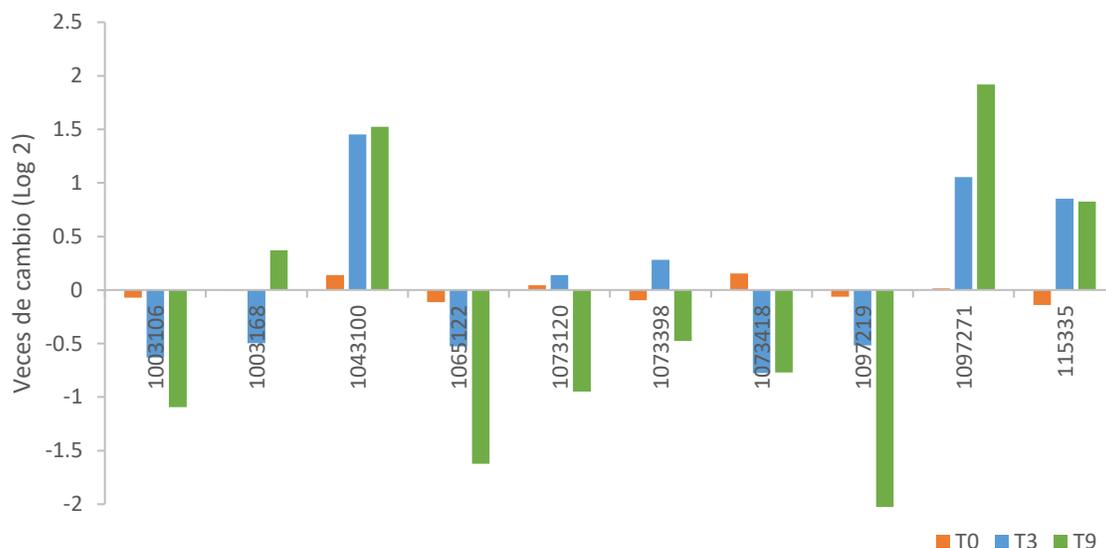
Al revisar la expresión del gen *mpd*, reportado como funcional, en el tiempo inicial (cero horas) en presencia de PM, este gen mostró un valor con un FC de 0.07, el nivel de expresión de este gen disminuyó en el tiempo de tres horas con un valor de -0.51, finalmente en el tiempo de nueve horas la expresión diferencial en este gen alcanzó un cambio de 0.71 (Figura 2.15). Estos resultados fueron inesperados ya que se esperaba un perfil de expresión alto, debido a que su producto proteico se relaciona con la hidrólisis de PM en ácido dimetiltiofosfórico y PNF, que es el primer paso en ambas vías de degradación bacteriana reportadas. Por esta razón, se evaluaron los perfiles de expresión de otros genes con función similar al gen *mpd*, de acuerdo a sus respectivos valores de veces de cambio.



**Figura 2.15.** Expresión diferencial del gen *mpd*. Las veces de cambio positivo significa mayor expresión en presencia de PM y negativo mayor expresión en la condición sin PM.

El gen *mpd* identificado en la cepa *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 muestra un porcentaje de similitud del 99% y con un valor de E-value de 0.0 con respecto a la secuencia del gen MpdB (con número de acceso AAY18224.1 reportada en la base de datos de GenBank) de *Burkholderia cepacia* reportado como responsable de la hidrólisis del PM en esta cepa. De acuerdo con esto, ambos genes se agrupan como Glioxilasa de la superfamilia de  $\beta$ -lactamasas II. Sin embargo, este gen de la cepa *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 no mostró expresión diferencial en la condición de PM. Por lo tanto, se realizó una búsqueda en el genoma parcial de *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 y se identificaron 10 probables hidrolasas, de los cuales solo cuatro de ellos mostraron cambios significativos en sus perfiles de expresión, dos GED en la condición experimental sin plaguicida y dos en la condición experimental con PM. En la primera condición, los genes identificados con los números de locus tag fueron 1097219 y 1065122 presentan un valor de veces de cambio de -0.06, -0.51 y -2.36; 0.11, -0.52 y -1.62 en los tiempos cero, tres y nueve horas. En la condición experimental con PM, los genes identificados con los números de locus tag 1043100 presentaron un valor de veces de cambio de 0.14, 1.45 y 1.52, en tanto que el locus tag 1097271 0.015, 1.05 y 1.91 en tiempo cero, tres y nueve horas respectivamente (Figura 2.16). Con estos datos

sugerimos que la hidrolasa(s) involucrada(s) en el primer pasó de la degradación del PM son los locus tag: 1043100 y 1097271, ambas inducibles por la presencia de PM.



**Figura 2.16.** Expresión diferencial de los 10 genes que codifican para Glioxilasa de la superfamilia de  $\beta$ -lactamasas II en los tiempos de cero, tres y nueve horas.

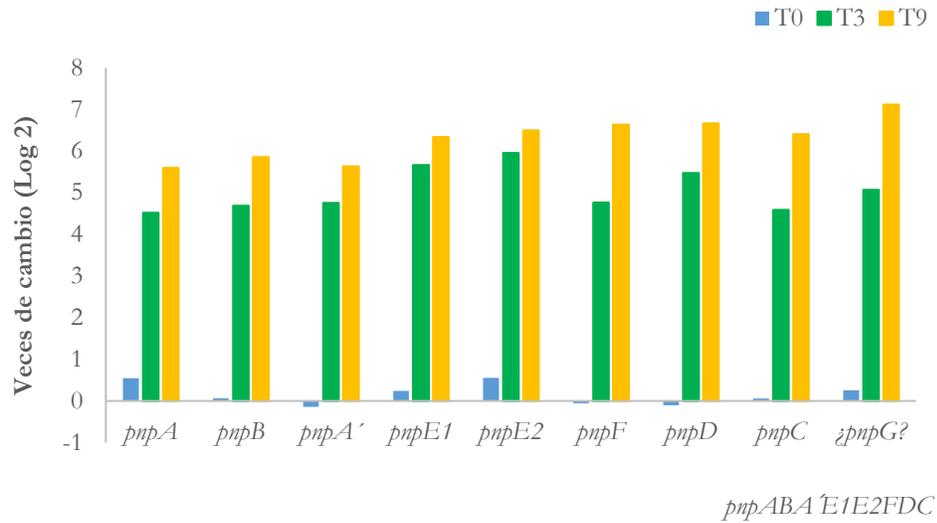
#### 2.4.11. Análisis de los clusters *pnpABA'E1E2FDC* y *pnpE1E2FDC* involucrado en la degradación de PNF

Posteriormente, se analizó el cluster *pnpABA'E1E2FDC* ubicado en el Contig 33 de la cepa *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 (Figura 2.17A) presenta un aumento en expresión conforme aumento el tiempo. El gen *pnpA* que codifica para la enzima *p-Nitrofenol monooxigenasa I*, está reportada en la degradación inicial del PNF y su función es oxidarlo, teniendo como producto *Benzoquinona*. Este gen se expresó en el tiempo inicial con un valor de veces de cambio de 0.5, el cual aumento en el tiempo de tres horas a 4.5 y 5.5 para el tiempo de nueve horas. Para el caso del gen *pnpB* (*Benzoquinona reductasa*) presentó un valor de veces de cambio de 0.06 para el tiempo de cero

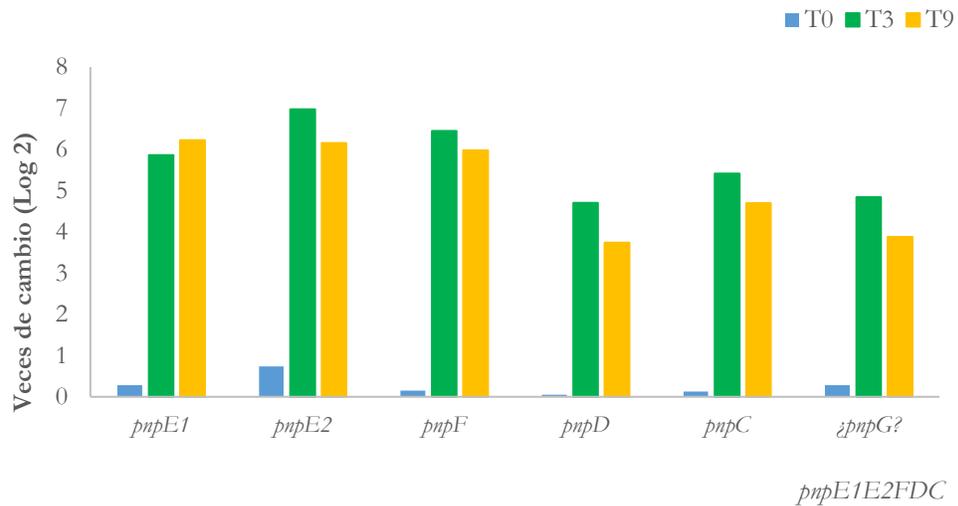
horas, 4.6 para el tiempo de tres horas y 5.8 para el tiempo de nueve horas. Para los genes *pnpA*, *pnpE1*, *pnpE2* (*Hidroquinona 1,2-dioxigenasa*) se encontró el mismo patrón de expresión, obteniendo valores de veces de cambio para el T0= -0.1, 0.2, 0.5; para el T3= 4.7, 5.6, 5.9 y para el T9= 5.6, 6.3, 6.4 respectivamente. Mientras tanto, para los genes *pnpF* (*4-Hidroximucónico semialdehído deshidrogenasa*), *pnpD* (*Maleiloacetato reductasa*) y *pnpC* (*Hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa*) los valores de veces de cambio para el tiempo cero son -0.06, -0.101 y 0.057, para el tiempo de tres horas valores de 4.7, 5.4 y 4.5 y finalmente para el tiempo de nueve horas valores de 6.6, 6.6 y 6.4 respectivamente. Finalmente, el gen *pnpG* el cual fue reportado por Popoca-Ursino *et al.* (2017) con posible actividad de *p-nitrofenol monooxigenasa-II*, se encontró una expresión de 0.25 para el tiempo de cero horas, de 5.0 para el tiempo de tres horas y 7.1 para el tiempo de nueve horas. En este cluster se muestran de manera general una expresión mayor en el tiempo de nueve horas.

Para el caso del cluster *pnpE1E2FDC* ubicado en el Contig 4 de *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 se observa que para el gen *pnpE1* se expresó diferencialmente en los tres tiempos, obteniendo valores de veces de cambio de 0.2 para el tiempo cero, de 5.8 para las tres horas y 6.2 para el tiempo de nueve horas. Sin embargo, para los genes *pnpE2*, *pnpF*, *pnpD*, *pnpC* y *pnpG* se observa un patrón de expresión desde el tiempo inicial hasta las tres horas y descendiendo en el tiempo de nueve horas, obteniendo valores de veces de cambio de 0.7, 0.1, 0.04, 0.1, 0.2 para el tiempo cero, para el tiempo de tres horas de 6.9, 6.4, 4.7, 5.4 y 4.8 y para el tiempo de nueve horas de 6.1, 5.9, 3.7, 4.7 y 3.8 respectivamente. En general este cluster muestra una mayor expresión en el tiempo de tres horas, donde está la máxima concentración de PNF en el medio (Figura 2.17B).

A).



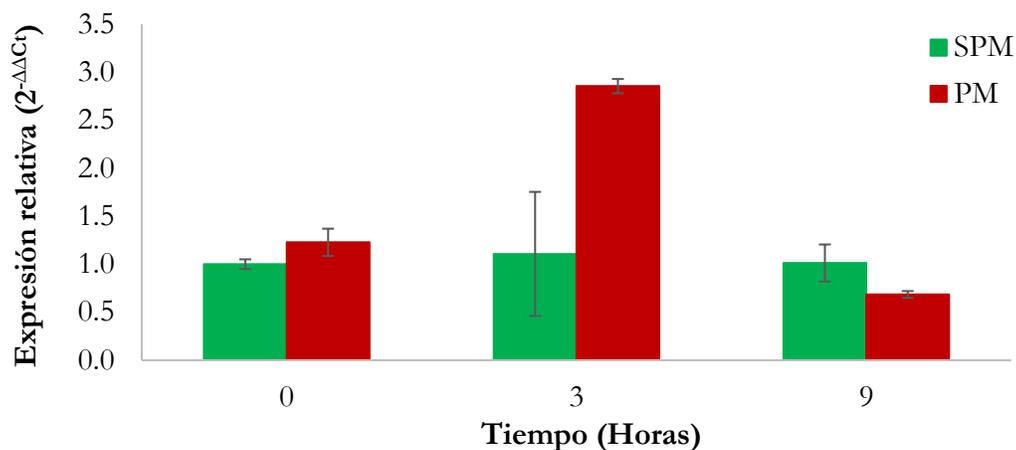
B).



**Figura 2.17.** A). Expresión diferencial del cluster *pnpABA'E1E2FDC* y B). Expresión diferencial del cluster *pnpE1E2FDC*.

## 2.4.12. Validación del gen *mpd* y del cluster *pnpABA 'E1E2FDC* por qRT-PCR

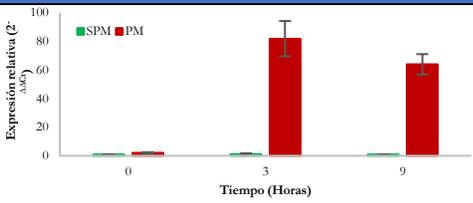
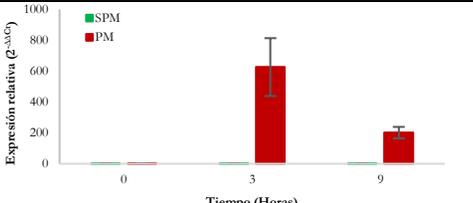
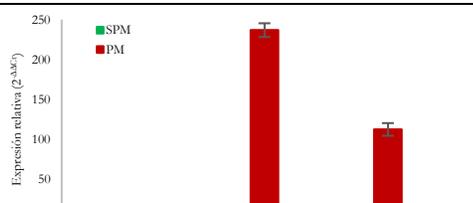
Los resultados de qRT-PCR fueron analizados utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). El gen *mpd* mostró un incremento en la condición con PM (Barras en color rojo) en comparación con la condición experimental sin PM (Barras en color verde) la cual mostró una expresión relativa de 1.0 en todos los tiempos de muestreo. Este gen es el responsable de la hidrólisis del PM en ácido dimetiltiofosfórico y PNF, que es el primer paso en ambas vías de degradación bacteriana reportadas (Figura 2.18).



**Figura 2.18.** Validación por qRT-PCR del gen *mpd*. Las barras en color verde representan la condición sin PM (SPM) y las barras en color rojo la condición con PM (PM). Los valores son promedio de los resultados de tres experimentos independientes, las barras de error representan la desviación estándar. De acuerdo con la prueba de t no pareada, no se encontraron diferencias significativas en la expresión relativa del gen *mpd* entre ambas condiciones experimentales en el tiempo de muestreo de cero horas ( $P= 0.0552$ ), sin embargo, en el tiempo de tres horas se muestra un incremento significativo en la expresión relativa del gen *mpd* en presencia del plaguicida ( $P= 0.0098$ ), mientras que en el tiempo de muestreo de nueve horas, la expresión relativa del gen *mpd* disminuyó significativamente ( $P=0.0462$ ) en la misma condición.

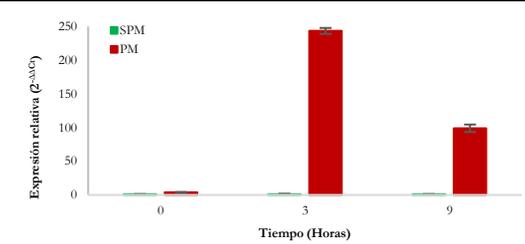
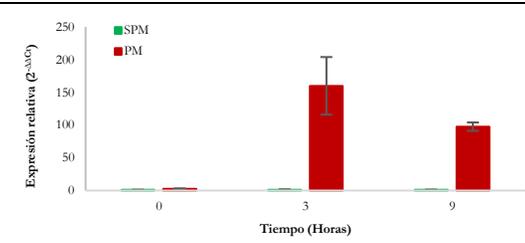
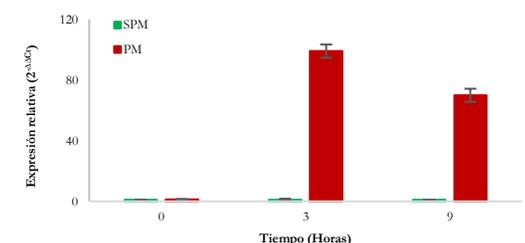
Asimismo, la expresión relativa del cluster de genes *pnpABA'E1E2FDC* fue comparable con la observada en el análisis transcriptómico. En la condición experimental sin PM, los genes mostraron una expresión relativa de 1.0 en todos los tiempos de muestreo (Barras en color verde). Sin embargo, en la condición con PM los resultados de qRT-PCR muestran un incremento en la expresión de todos los genes (Barras en color rojo), uno de los genes con mayor expresión fue el gen *pnpA'* con un valor de 1.57 a las 0 horas, y el perfil de expresión incremento con el tiempo con 625.93 y 201.61 a las 3 y 9 horas respectivamente (Tabla 2.5).

**Tabla 2.5.** Perfiles de expresión de los genes involucrados en la degradación de PNF en *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3. Los valores representan el promedio y la desviación estandar.

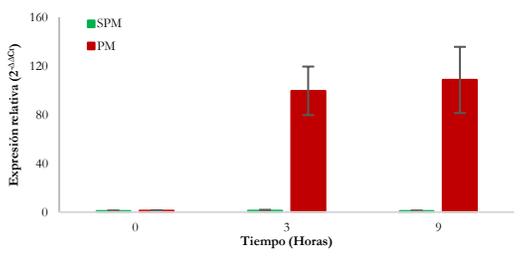
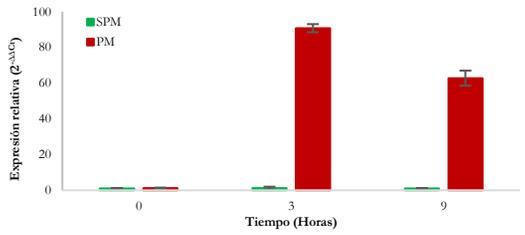
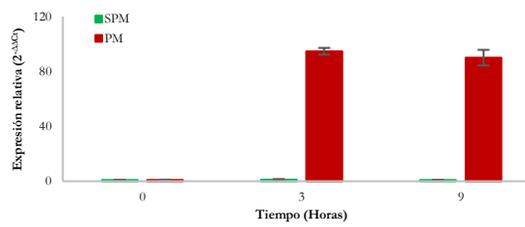
Nombre del gen	Nombre de la enzima	0 Horas	3 Horas	9 Horas	Figura
		qRT-PCR (PM)			
<i>pnpA</i>	p-nitrofenol monooxigenasa I	2.02±0.53	81.86±12.40	63.96±7.11	
<i>pnpA'</i>	p-nitrofenol monooxigenasa I	1.57±1.37	625.93±187.32	201.61±37.12	
<i>pnpB</i>	Benzoquinona reductasa	1.35±0.24	236.76±8.60	112.14±7.96	

Barras en color verde representan

Continuación de la Tabla 2.5.

Nombre del gen	Nombre de la enzima	0 Horas	3 Horas	9 Horas	Figura
		qRT-PCR (PM)			
<i>pnpE2</i>	Hidroquinona 1,2-dioxigenasa	3.71±0.60	243.34±4.44	98.92±5.52	
<i>pnpE1</i>	Hidroquinona 1,2-dioxigenasa	2.55±0.62	159.95±44.03	97.60±6.41	
<i>pnpF</i>	4-Hidroximucónico semialdehido dehidrogenasa	1.25±0.31	99.11±4.36	69.96±4.33	

Continuación de la Tabla 2.5.

Nombre del gen	Nombre de la enzima	0 Horas	3 Horas	9 Horas	Figura
		qRT-PCR (PM)			
<i>pnpD</i>	Maleilacetato reductasa	1.07±0.42	99.58±19.95	108.52±27.19	
<i>pnpG?</i>	p-nitrofenol monooxigenasa II	1.15±0.38	90.74±2.28	62.78±4.21	
<i>pnpC</i>	Hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa	1.01±0.15	94.59±2.46	90.00±5.64	

## 2.5. CONCLUSIONES

- El plaguicida PM y el PNF son compuestos que inducen a la cepa a una expresión diferencial de genes involucrados en el proceso de degradación.
- De acuerdo a nuestros resultados, el número de GED's en el tiempo cero es el más bajo (8), incrementando conforme avanza la cinética, siendo el tiempo tres horas y nueve horas donde hay la mayor cantidad de GED's (1132). Lo que demuestra el efecto del plaguicida en el transcriptoma de la bacteria.
- Bajo las condiciones experimentales de este trabajo, en *B. zhejiangensis* CEIB S4-3 se identificaron los reguladores involucrados en la respuesta inicial en presencia del plaguicida. Los resultados de los GED del tiempo inicial, sugieren que inicia con el regulador transcripcional MarR, un represor que controla los genes que codifican para proteínas de las bombas de flujo localizadas en membrana.
- La presencia de transportadores, permeasas y porinas sugieren ser indispensables para el traspaso del PNF hacia la célula, además del intercambio de moléculas, para contender con la toxicidad de los metabolitos.
- Respecto a la respuesta de las tres y nueve horas, se observa constante en la condición de PM, una mayor expresión de genes que pertenecen al COG [C] referente a la Producción y Conversión de Energía y al COG [K] de Transcripción. El primero demuestra la falta de glucosa, y la presencia de PM, permite a la bacteria la producción de ATP a través de vías alternativas. Por otro lado, la presencia del PM provoca la expresión de factores de transcripción a diferencia de la condición en ausencia de PM donde la bacteria expresa un menor número de reguladores probablemente para el mantenimiento básico del metabolismo.
- Los resultados de KEGG respaldan y fortalecen el modelo de degradación de la cepa, ya que las vías de los GED's correlacionan con reportes previos de organismos expuestos a PNF (Chakka *et al.*, 2015). Por ejemplo, el Metabolismo del Propanoato presente solo

en la condición con PM a partir del tiempo tres horas, o la expresión de la succinato deshidrogenasa del TCA.

- Finalmente, todos los genes involucrados directamente en la degradación del PNF, en la bacteria, se expresan de manera similar a las tres y nueve horas, y al igual que el resto *pnpABA'E1E2FDC* tienen mayor veces de cambio y expresión relativa respecto a los valores de este mismo grupo en la cepa, lo que podría explicar la velocidad de la total degradación de PM en 12 horas por la bacteria.

## 2.6. LITERATURA CONSULTADA

- Albers, P., Weytjens, B., De Mot, R., Marchal, K., & Springael, D. (2018). Molecular processes underlying synergistic linuron mineralization in a triple-species bacterial consortium biofilm revealed by differential transcriptomics. *MicrobiologyOpen*.
- Auer, P. L., & Doerge, R. W. (2010). Statistical design and analysis of RNA sequencing data. *Genetics*, 185(2), 405-416.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P., & Hobman, J. L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 145-163.
- Chakka, D., Gudla, R., Madikonda, A. K., Pandeti, E. V. P., Parthasarathy, S., Nandavaram, A., & Siddavattam, D. (2015). The organophosphate degradation (opd) island borne esterase induced metabolic diversion in *E. coli* and its influence on p-nitrophenol degradation. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M115.
- Chen, Q., Tu, H., Luo, X., Zhang, B., Huang, F., Li, Z., Wang J., Shen W., Wu J., & Cui, Z. (2016). The Regulation of para-Nitrophenol Degradation in *Pseudomonas putida* DLL-E4. *PLoS One*, 11(5), e0155485.
- Díaz, E., & Prieto, M. A. (2000). Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(5), 467-475.

- Galperin, M. Y., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2014). Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D261-D269.
- Garber, M., Grabherr, M. G., Guttman, M., & Trapnell, C. (2011). Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature Methods*, 8(6), 469-477.
- Hoskisson, P. A., & Rigali, S. (2009). Variation in form and function: the helix-turn-helix regulators of the GntR superfamily. *Advances in Applied Microbiology*, 69, 1-22.
- Hrdlickova, R., Toloue, M., & Tian, B. (2017). RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8(1).
- Huang, C. J., Wang, Z. C., Huang, H. Y., Huang, H. D., & Peng, H. L. (2013). YjcC, a c-di-GMP phosphodiesterase protein, regulates the oxidative stress response and virulence of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *PloS One*, 8(7), e66740.
- Krell, T., Molina-Henares, A. J., & Ramos, J. L. (2006). The IclR family of transcriptional activators and repressors can be defined by a single profile. *Protein Science*, 15(5), 1207-1213.
- Liao, H. Y., Chien, C. C., Tang, P., Chen, C. C., Chen, C. Y., & Chen, S. C. (2018). The integrated analysis of transcriptome and proteome for exploring the biodegradation mechanism of 2, 4, 6-trinitrotoluene by *Citrobacter* sp. *Journal of Hazardous Materials*, 349, 79-90.
- Liu, J., Wang, S., Qin, T., Li, N., Niu, Y., Li, D., Yuan, Y., Geng, H., Xiong, L., & Liu, D. (2015). Whole transcriptome analysis of *Penicillium digitatum* strains treated with prochloraz reveals their drug-resistant mechanisms. *BMC Genomics*, 16(1), 855.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 25, 402-408.
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., & Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLoS Computational Biology*, 13(5), e1005457.
- Lu, W., Li, L., Chen, M., Zhou, Z., Zhang, W., Ping, S., Yan, Y., Wang J., & Lin, M. (2013). Genome-wide transcriptional responses of *Escherichia coli* to glyphosate, a potent

- inhibitor of the shikimate pathway enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Molecular BioSystems*, 9(3), 522-530.
- Martínez-Ocampo, F. (2015). Ensamblaje del genoma de *Burkholderia* sp. y análisis de la anotación funcional de genes involucrados en la degradación de compuestos organofosforados. Tesis de Maestría en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Cuernavaca, Morelos, México.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5(7), 621-628.
- Namouchi, A., Gómez-Muñoz, M., Frye, S. A., Moen, L. V., Rognes, T., Tønjum, T., & Balasingham, S. V. (2016). The *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional landscape under genotoxic stress. *BMC Genomics*, 17(1), 791.
- Perera, I. C., & Grove, A. (2010). Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2(5), 243-254.
- Popoca-Ursino, E. C., Martínez-Ocampo, F., Dantán-González, E., Sánchez-Salinas, E., & Ortiz-Hernández, M. L. (2017). Characterization of methyl parathion degradation by a *Burkholderia zhejiangensis* strain CEIB S4-3 isolated from agricultural soils. *Biodegradation*, 28(5-6), 351-367.
- Romero-Rodríguez, A., Robledo-Casados, I., & Sánchez, S. (2015). An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(8), 1017-1039.
- Singh, O. V., & Nagaraj, N. S. (2006). Transcriptomics, proteomics and interactomics: unique approaches to track the insights of bioremediation. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 4(4), 355-362.
- Soto S., J. C., & López C., C. E. (2014). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*, 16(2), 101-113.

- Strickler, S. R., Bombarely, A., & Mueller, L. A. (2012). Designing a transcriptome next-generation sequencing project for a nonmodel plant species1. *American Journal of Botany*, 99(2), 257-266.
- Suganth, D., Paniz-Mondolfi, A., & Monzon, F. A. (2015). Transcriptome Sequencing (RNA-Seq). In *Genomic Applications in Pathology* (pp. 31-43). Springer New York.
- Svedružić, D., Jónsson, S., Toyota, C. G., Reinhardt, L. A., Ricagno, S., Lindqvist, Y., & Richards, N. G. (2005). The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433(1), 176-192.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, 14(2), 178-192.
- Tiwari, B., Verma, E., Chakraborty, S., Srivastava, A. K., & Mishra, A. K. (2018). Tolerance strategies in cyanobacterium *Fischerella* sp. under pesticide stress and possible role of a carbohydrate-binding protein in the metabolism of methyl parathion (MP). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 127, 217-226.
- Tropel, D., & Van Der Meer, J. R. (2004). Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 474-500.
- Wang, J. P., Zhang, W. M., Chao, H. J., & Zhou, N. Y. (2017). PnpM, a LysR-type transcriptional regulator activates the hydroquinone pathway in para-nitrophenol degradation in *Pseudomonas* sp. strain WBC-3. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1714.
- Wang, L., Feng, Z., Wang, X., Wang, X., & Zhang, X. (2010). DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*, 26(1), 136-138.
- Ward, J. A., Ponnala, L., & Weber, C. A. (2012). Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *American Journal of Botany*, 99(2), 267-276.

- Yang, J. W., Zheng, D. J., Cui, B. D., Yang, M., & Chen, Y. Z. (2016). RNA-seq transcriptome analysis of a *Pseudomonas* strain with diversified catalytic properties growth under different culture medium. *MicrobiologyOpen*, 5(4), 626-636.
- Zhang, T., Tang, J., Sun, J., Yu, C., Liu, Z., & Chen, J. (2015). Hex1-related transcriptome of *Trichoderma atroviride* reveals expression patterns of ABC transporters associated with tolerance to dichlorvos. *Biotechnology Letters*, 37(7), 1421-1429.

## CAPÍTULO III

### ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 DURANTE LA DEGRADACIÓN DEL PARATIÓN METÁLICO

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

La proteómica ha sido considerada como una metodología efectiva para entender las funciones de las proteínas que se expresan diferencialmente. La proteómica es una disciplina utilizada para el análisis de las proteínas expresadas por un organismo, así como su función y estructura, tejido o una célula en un punto de tiempo específico en condiciones ambientales definidas. Hoy en día, la proteómica se ha utilizado para muchos fines de investigación, incluyendo la biodegradación de compuestos xenobioticos (Chauhan y Jain, 2010). Con el uso de la proteómica, se puede determinar el perfil de expresión de proteínas relacionadas a cepas individuales o comunidades microbianas. Además, proporciona una visión global de la expresión de proteínas de los sistemas biológicos y, en combinación con otras tecnologías ómicas, tiene un papel importante en ayudar a descubrir los mecanismos de estos procesos celulares y de esta manera avanzar en el desarrollo de las biotecnologías ambientales.

La proteómica aborda tres categorías de interés biológico que incluyen la expresión, estructura y función de proteínas. Las tecnologías proteómicas en general involucran tres pasos, los cuales son separación y/o fraccionamiento, cuantificación e identificación de la proteína en una muestra biológica en particular (Tabla 3.1). También la proteómica es una de las tecnologías modernas utilizadas para los estudios de microorganismos o comunidades microbianas implicadas en el proceso de biorremediación de contaminantes (Chakraborty *et al.*, 2012).

El proteoma ha sido definido como el complemento del genoma (Jungblut *et al.*, 2008). Además, el proteoma permite conocer los mecanismos de modificación postraduccionales de las proteínas, cómo afectan los cambios en las proteínas a los aspectos fundamentales de su

funcionalidad. El término proteoma y proteómica fue acuñado en 1995 por Marc Wilkins (James, 1997; Singh y Nagaraj, 2006).

**Tabla 3.1.** Tecnologías usadas en proteómica.

Tecnología	Usos
Electroforesis en geles 2D	Se utiliza para identificar proteínas de baja abundancia.
Espectrometría de masa en Tandem	Se utiliza para separar iones en muestras de masa electrónica, para identificar intermediarios catabólicos de compuestos tóxicos.
Espectrometría de masas (MALDI-TOF)*	Se utiliza para el análisis de muestras termolábiles, compuestos orgánicos no volátiles o de alto peso molecular como proteínas, péptidos, glicoproteínas, oligosacáridos y oligonucleótidos.
Espectrometría de masas (ICP-MS)**	Involucra la formación de una nube de gas que contiene electrones, iones y partículas neutras. Se utiliza para la cuantificación ultrasensible de proteínas y péptidos en rangos molares muy pequeños (attomoles, $1 \times 10^{-18}$ moles).
Microarreglos	Estos son matrices con proteínas seleccionadas unidas a ellas, que permiten seleccionarlas de acuerdo al monitoreo de su actividad.

\*MALDI-TOF: Desorción/ionización laser asistida por matriz- tiempo de vuelo; \*\*ICP: Plasma de acoplamiento inductivo (Modificado de Chauhan y Jain, 2010).

Por lo que, realizar el análisis de proteínas diferencialmente expresadas en respuesta a la presencia de plaguicidas, es importante para entender qué tipo de proteínas están involucradas en la tolerancia a dichos plaguicidas o las que son responsables para la regulación del proceso de degradación de los mismos. Lo que resulta más relevante es poder correlacionar los cambios en los patrones de expresión de proteínas contra el patrón de expresión normal que presentan los genes involucrados en los procesos de degradación de los plaguicidas.

En este trabajo el proteoma es importante no solo para analizar el comportamiento celular durante el metabolismo de plaguicidas, sino también para integrar la información entre el

genoma y el transcriptoma de la cepa, los metabolitos resultantes y tener un panorama más holístico del proceso. Se hace especial énfasis en la respuesta fisiológica y el proteoma de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 bajo el estrés del paratión metílico y en ausencia de otra fuente de carbono.

En este capítulo se analizan las proteínas con expresión diferencial en la condición con y sin PM, que permita conocer el patrón de expresión de las proteínas involucradas en la biodegradación del plaguicida, así como de aquellos procesos biológicos que ocurren en la célula.

### 3.2. OBJETIVO

Llevar a cabo un análisis proteómico de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en respuesta a la presencia y ausencia del plaguicida paratión metílico.

### 3.3. METODOLOGÍA

Para el análisis de proteómica, se obtuvieron 18 muestras de la cinética de crecimiento de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en presencia y ausencia de PM a 50 mg/L, con los mismo tiempos cero, tres y nueve horas por triplicado cada uno (ver capítulo 1). Las muestras fueron obtenidas de la siguiente manera:

7. Al inicio de la cinética en el tratamiento donde *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 se puso en contacto con el PM (inmediatamente se registró la presencia del PNF).
8. Al inicio de la cinética con *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en ausencia de PM.
9. A las tres horas con la cepa en presencia del PM, donde el PNF alcanza su máxima concentración.
10. A las tres horas, en ausencia de PM.
11. A las nueve horas en presencia de la cepa y cuando el PNF se está degradando.

12. A las nueve horas, en ausencia de PM.

### 3.3.1. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó de acuerdo con el método basado en el uso de fenol ácido. Se tomaron 50 ml del cultivo de las cepas (en presencia y ausencia de los plaguicidas respectivos) y se centrifugaron a 1400 g, por 15 minutos y a 20°C. Los pellets se lavaron con buffer PBS ( $K_2HPO_4$  7.1 mM,  $KH_2PO_4$  2.9 mM y NaCl 151 mM en agua doble destilada, pH 7.0) y posteriormente fueron resuspendidos en 1 mL de buffer SDS (Tris 100 mM pH 9.5 y SDS 1% w/v). A seguir, las células se sonicaron, cinco pulsos de 30 segundos y descanso en hielo por un minuto en cada ciclo, se precipitaron con dos volúmenes de acetona absoluta, y se dejó reposar toda la noche (Encarnación *et al.*, 2005; Cocotl-Yañez *et al.*, 2014).

Posteriormente, se realizó la extracción de proteína total. El extracto fue centrifugado a 7,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se retiró la acetona. Enseguida se vertieron 3 ml de buffer de extracción cuya composición en g/l es: Sacarosa, 23.6; Tris-base, 6.06; KCl, 0.75; EDTA, 25;  $\beta$ -mercaptoetanol, 2; HCl, 0.24; PVPP, 1.2. Se dejó reposar cinco minutos en hielo, después a cada muestra se adicionaron 3 ml de fenol equilibrado, homogenizando mediante vortex, y se dejaron en reposo durante 10 minutos, para después centrifugar a 7,000 rpm durante 10 minutos; se recolectó la parte fenólica del tubo y se pasó a tubos limpios para adicionar tres volúmenes de acetato de amonio en metanol al 0.1 M, y se dejó toda la noche, para después centrifugar como en condiciones anteriores y decantar. Enseguida la pastilla celular se disgregó tres veces con 3 ml de acetato de amonio, y un lavado con acetona al 80%, al final los tubos se dejaron secar, en cada lavado se centrifugó a 7,000 rpm durante 10 minutos y se decantó. La pastilla se resuspendió con 500  $\mu$ l de buffer de solubilización (TBP) el cual su composición en g/l es: Urea, 4.207; Thiourea, 1.522; CHAPS, 0.900; TBP, 0.100; Anfólitos pH 3- 10 al 40%, 0.200; DTT, 0.093; se vertió en tubos Eppendorf, para centrifugar a 10,000 rpm durante 30 minutos, transcurrido el

tiempo se obtuvo la parte líquida y se guardó en tubos limpios (Encarnación *et al.*, 2005). La muestra de proteína se cuantificó mediante el método de Bradford (1976).

### **3.3.2. Electroforesis en geles de primera y segunda dimensión**

Se elaboraron geles en primera dimensión de isoelectroenfoque, los cuales presentan un contenido de: Urea, 5.7 g; NP-40, 2.0 ml; CHAPS, 0.3 g; Poliacrilamida, 13 ml; anfolito de 4-6.5, 162.1  $\mu$ l; anfolito de 3-10, 104.8  $\mu$ l; anfolito de 5-8, 162.1  $\mu$ l; persulfato de amonio al 10%, 49.6  $\mu$ l. Se cargaron 500  $\mu$ g del extracto proteico total, los geles se corrieron a 1500 volts/hora por 23 horas, obtenidos los geles se depositaron en un “caster” donde se lavaron con buffer de equilibrio durante cinco minutos, el cual su composición en g/l es: DTT, 0.38 g; azul de bromofenol, 0.5; buffer de equilibrio analítico 50 ml. Posteriormente se retiró el buffer y se lavaron dos veces con 3 volúmenes del mismo dejando reposar por cinco minutos en cada lavado, para posteriormente montarlos en el gel de segunda dimensión (Encarnación *et al.*, 2005; Cocotl-Yañez *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014).

Se realizaron geles en segunda dimensión SDS-PAGE (poliacrilamida al 12%, 211 ml; Tris-HCl pH 8.8, 130 ml; H<sub>2</sub>O, 180.5 ml; SDS, 11.7ml; persulfato de amonio, 2.9 ml; TEMED, 0.376  $\mu$ l), donde las proteínas son separadas en función a su peso. Se dejaron polimerizar por una hora, y se montó el gel 1D en el 2D, se colocaron en la cámara para electroforesis, enseguida se vertieron 2 L de buffer Tris-Glicina-SDS a 10X, el cual presenta un contenido de: Tris-Base, 30.28 g; Glicina, 144.10 g; SDS, 10 g; de esta se tomaron 400 ml y se adicionaron en 1,600 ml de agua quedando a 2X. Posteriormente, para la corrida se empleó voltaje constante de 1900 Volts/hora durante 24 horas. Enseguida de la corrida, los geles se sometieron a un proceso con solución fijadora (50% metanol, 10% ácido acético y 40% H<sub>2</sub>O) y se dejaron reposar por una hora para después teñirlos con azul de coomassie brillante y se estabilizaron con solución de Tris Base 0.1M pH 6.5 por cinco minutos (Fanous *et al.*, 2007), transcurrido el tiempo se lavaron con

metanol: agua a 25:75 para extraer el excedente de coomassie, por último, se estabilizaron durante una hora en 500 ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 20%.

### **3.3.3. Digitalización y análisis de los geles de segunda dimensión**

Los geles se digitalizaron mediante un scanner de tipo (GS-800 Calibrated Densitometer) y el programa Quantity one, posteriormente se usó el programa PDQuest Advanced 8.0.1. (Martinotti y Ranzato, 2016), con el fin de analizar los geles de una manera cuantitativa, para lograr la ubicación y búsqueda de spots de interés. Así mismo, el programa proporciona el nivel de expresión de los spots de acuerdo a la intensidad y tamaño.

### **3.3.4. Identificación de proteínas por espectrofotometría de masas MALDI-TOF**

Se generó un análisis por medio de PDQuest en donde se ubicaron una serie de spots los cuales están involucrados en la expresión diferenciada de la cepa, marcados cada uno de ellos se localizaron en el gel 2D y fueron cortados manualmente con una navaja fina, y se colocaron en un tubo Eppendorf previamente rotulado con el número del spot y se realizó a cada uno dos lavados de una hora cada uno, con un mililitro de agua mili Q.

Para desteñir las fracciones de gel que contiene el spot se usó solución desteñidora la cual su contenido es acetonitrilo: agua miliQ 50:50, siendo que a esta última se adicionaron 250  $\mu\text{l}$  de bicarbonato de amonio al 2.5 mM, en seguida se dieron dos lavados con 1 mL a cada tubo desteñendo durante dos horas, después se deshidrataron mediante dos lavados con acetonitrilo puro durante 10 minutos, y se dejaron secar.

Después a cada muestra se le colocaron 30  $\mu\text{l}$  de DTT 15 mM y se redujeron las proteínas por media hora, terminado el tiempo se les dio un spin y se desechó el líquido, y se alquilaron con 30  $\mu\text{l}$  de iodoacetamida al 100 mM, dejándolas alquilar durante media hora a 37°C en la oscuridad, cuando transcurrió el tiempo, se dio un spin y se retiró la iodoacetamida y se

desechó, después se vertieron 100  $\mu$ l de acetonitrilo puro para deshidratar el spot por 10 minutos, se desechó el líquido y se hidrató el spot con bicarbonato de amonio durante 10 minutos y se desechó el bicarbonato, en seguida se pusieron 100  $\mu$ l de acetonitrilo y se deshidrataron las piezas por 10 minutos, se desechó el acetonitrilo y las muestras se dejaron secar durante 3 minutos.

Para hacer la digestión se colocaron 9  $\mu$ l de enzima tripsina a cada muestra y se dejaron reposar durante 30 minutos, transcurrido el tiempo se retiró el sobrante de tripsina y se adicionaron 15  $\mu$ l de agua miliQ, dejando reposar toda la noche.

Después se extrajeron los péptidos con solución de extracción la cual contenía 5 ml de agua miliQ y 5.5  $\mu$ l de ácido trifluoroacético (TFA,) de ésta se colocaron 50  $\mu$ l a cada muestra y se dejaron en agitación durante 30 minutos, se colectó el líquido en tubos de 500  $\mu$ l, a los spots sin líquido se les adicionó agua miliQ, acetonitrilo 50:50 más 5.5  $\mu$ l de TFA, y las muestras se dejaron en agitación durante 30 minutos, el líquido obtenido se pasó a los tubos Eppendorf de 500  $\mu$ l rotulados con el número de cada spot, después se adicionó solución: agua miliQ, acetonitrilo 30:70, más 5.5  $\mu$ l de TFA, y se colocaron 50  $\mu$ l a cada muestra y se agitaron durante 30 minutos, se colectó el líquido en se puso en los Eppendorf de 500  $\mu$ l. Finalmente se obtuvo un volumen de 150 $\mu$ l en cada muestra. A continuación, el extracto se redujo aproximadamente a 10 $\mu$ l, mediante evaporación en una centrifuga de vacío a temperatura ambiente.

Para la identificación se colocaron 0.5  $\mu$ l del estándar de péptidos en los pocillos de la placa MALDI-TOF, y se dejaron secar, después se añadieron 0.5  $\mu$ l de matriz saturada la cual su contenido es 4mg de HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico), 200  $\mu$ l de acetonitrilo/agua al 33% (V/V), más TFA al 0.1% y se dejaron secar los pocillos, ya que se habían secado completamente, la porta muestras se introdujo en el MALDI-TOF para generar una identificación mediante las masas de los péptidos (Fanous *et al.*, 2007).

La lista de masas para cada muestra se analizó utilizando el programa MASCOT v2.1.0 (MatrixScience; <http://www.matrixscience.com>) y comparadas también con la base de datos no redundante del NCBI. Las secuencias generadas de los péptidos fueron comparadas con la base de datos Swiss-Prot (<http://www.expasy.org>) con ayuda del programa MPMsearch (European Institute of Bioinformatics, EBI). Solo las proteínas con masas moleculares y pI con valores similares a los determinados en los geles de 2-DE, cobertura de secuencia y patrón de digestión fueron anotadas como identificadas, las que no cumplan fueron anotadas como desconocidas.

### 3.3.5. Conjunto de Grupos de Ortólogos de Proteínas (COGs)

Las proteínas identificadas de cada tiempo fueron clasificadas de acuerdo a su función según las categorías funcionales del COG. La base de datos de COGs tiene como objetivo clasificar en grupos de ortólogos, a las proteínas de microorganismos que conocemos su genoma completo. Para esto se utilizó la base de datos de Integrated Microbial Genomes & Microbiomes (IMG/M), la cual se encuentra en la siguiente dirección electrónica: <https://img.jgi.doe.gov> de las proteínas de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3. Para realizar este análisis se revisó el listado de proteínas y se clasificaron de acuerdo con un *ratio* hasta  $\pm 2.0$ .

### 3.3.6. Análisis de la anotación funcional de los genes

Para ubicar las proteínas, de ambas condiciones, de los tiempos cero, tres y nueve horas, en las vías metabólicas fueron sometidos a un análisis en la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway Color. Se obtuvo el gen Knock out (KO) de la base de datos de Integrated Microbial Genomes & Microbiomes (IMG/M) la cual se encuentra en la dirección electrónica: <https://img.jgi.doe.gov>, y este KO fue utilizado en la base de datos del KEGG ([http://www.genome.jp/kegg/tool/map\\_pathway2.html](http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html)) utilizando a *Burkholderia sp.* RPE67 con el código de organización “bue”.

### 3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.4.1. Concentración de proteínas

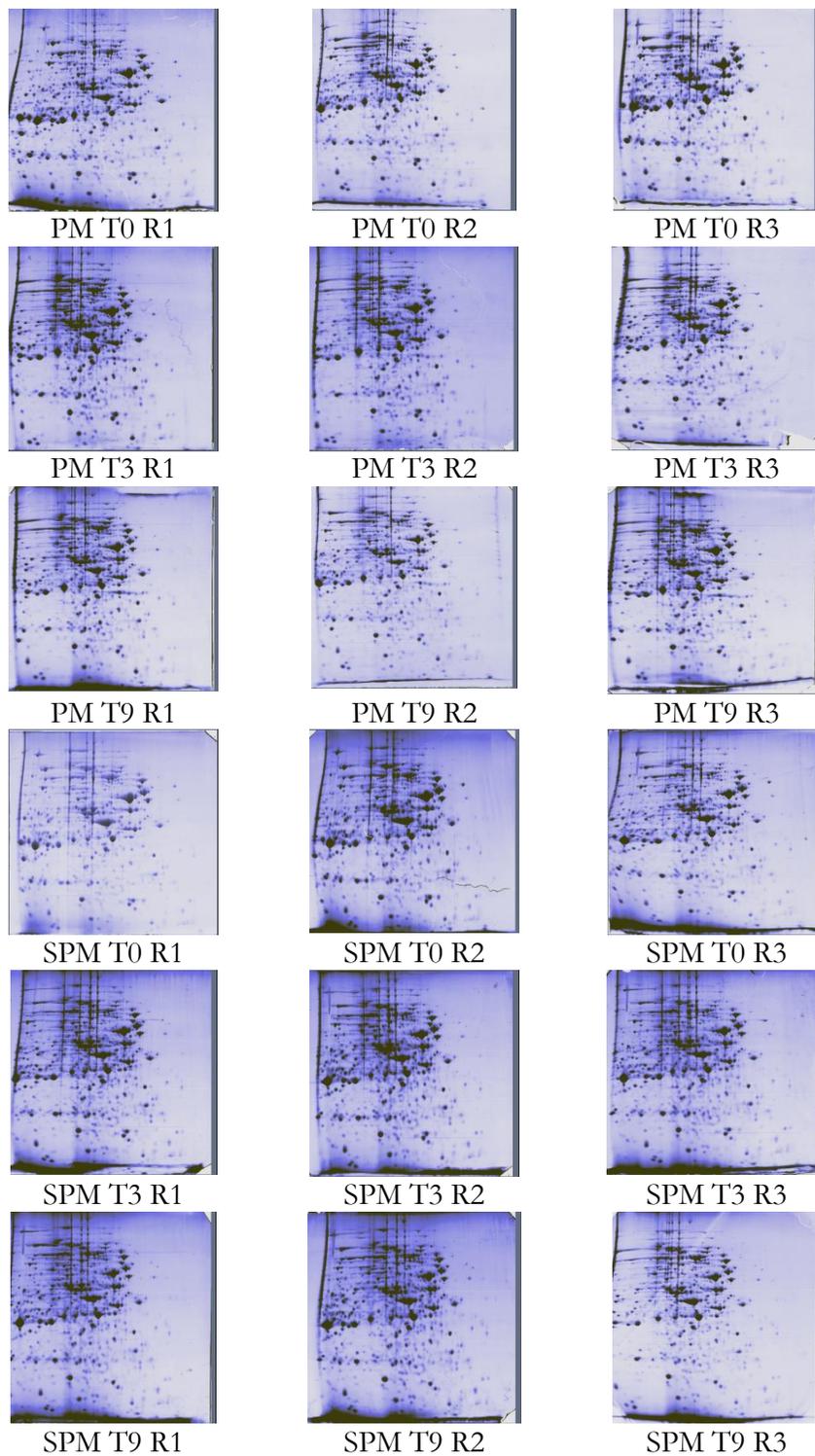
Se realizó la extracción de proteínas utilizando el procedimiento a base de fenol y se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford modificado, la cual se muestra en la tabla 3.2. Obteniendo una concentración de proteína de 12.1 y de 10.3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en promedio en la condición con y sin plaguicida, respectivamente. Esta diferencia puede deberse a la presencia del PNF el cual puede ser utilizado por la bacteria como fuente de carbono.

**Tabla 3.2.** Concentración de proteína.

Tiempo de muestreo (Horas)	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	
	Con plaguicida (50 mg/L)	Sin plaguicida
0	$11.56 \pm 1.2$	$9.73 \pm 2.5$
3	$13.06 \pm 1.2$	$11.0 \pm 0.8$
9	$11.93 \pm 1.1$	$10.2 \pm 1.5$

#### 3.4.2. Electroforesis en geles de dos dimensiones

Primeramente, se llevó a cabo la electroforesis en primera dimensión usando anfolitos con un pH entre 4 y 8, utilizando 500  $\mu\text{g}$  de proteína. Posteriormente se realizó la separación de proteínas de acuerdo a su masa molecular, utilizando electroforesis bidimensional. Después de la electroforesis, los geles se fijaron y tiñeron con azul de Coomassie solución R350, y se digitalizaron utilizando un analizador de imágenes. En la figura 3.1 se muestran los 18 geles realizados, en los cuales podemos observar los diferentes spots expresados en las diferentes condiciones experimentales (con y sin plaguicida) y en los tres tiempos (cero, tres y nueve horas).



**Figura 3.1.** Electroforesis bidimensional de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3. PM: Paratión Metílico, SPM: Sin Paratión Metílico, T: Tiempo y R: Repetición.

### 3.4.3. Análisis de los geles bidimensionales en PDQuest

Con ayuda del software de PDQuest Advanced 8.0.1 se analizaron los geles bidimensionales, identificando los spots y asignándoles un número de identificación. Así mismo, el programa realiza un análisis cualitativo y cuantitativo de los spots, los cuales permiten identificar spots diferenciales entre los diferentes tratamientos y diferencias en los niveles de expresión.

Se llevó a cabo un análisis estadístico en los tres tiempos, con el objetivo de obtener los spots expresados diferencialmente de acuerdo con su densidad óptica, es decir, los spots se encuentran en ambos tratamientos y replicas, pero la diferencia de expresión radica en la densidad óptica que presenta o intensidad del spot; en el cual se utilizó a un 99% de confiabilidad.

Además, se realizó un análisis cualitativo a través de PDQuest, para obtener aquellos spots que se están expresando en una condición y no en otra (es decir los propios de cada condición), obteniendo un mayor número de spots propios en la condición sin plaguicida (89) con respecto a la condición con PM (34 spots), además, se muestra que en el tiempo de tres horas y en las dos condiciones experimentales existe un incremento en el número de spots, 17 spots en la condición con PM y 53 spots en la condición sin PM (Anexo 1-9). En la condición con PM y en este tiempo (tres horas), se observó en la cinética de crecimiento la máxima concentración del metabolito PNF, lo cual puede ocasionar que este metabolito está induciendo la expresión de proteínas en la célula. Por otro lado, en la condición sin PM la célula puede estar en estrés por la falta de una fuente carbono y llevando a cabo procesos biológicos con la finalidad de sobrevivir. En la tabla 3.3 se muestran los spots diferenciales presentes en las réplicas con y sin plaguicida.

**Tabla 3.3.** Comparaciones de spots expresados en los diferentes tiempos con y sin plaguicida.

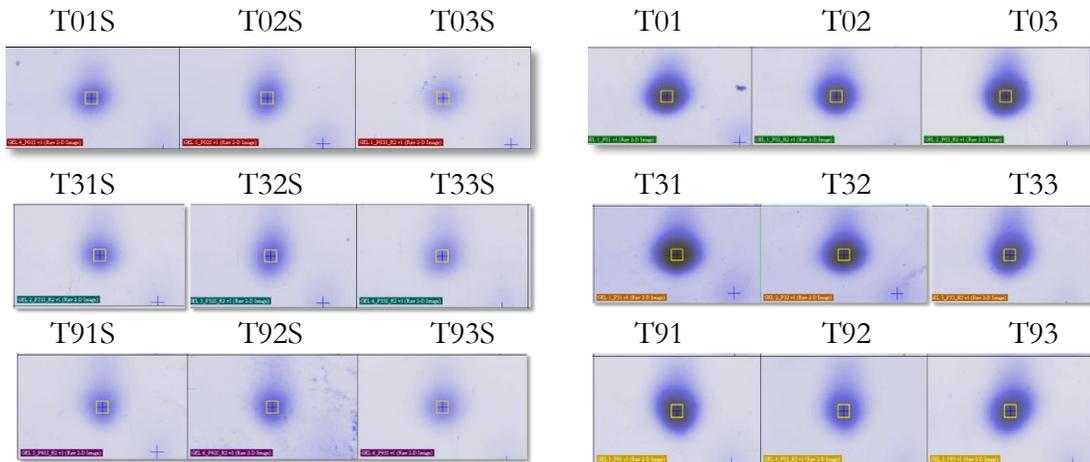
Tiempo de muestreo	Tratamiento	Promedio de spots de las tres replicas	Spots propios expresados
<b>0 Horas</b>	PM	589	6
	Sin PM	727	13
<b>3 Horas</b>	PM	573	17
	Sin PM	689	53
<b>9 Horas</b>	PM	558	11
	Sin PM	568	23

**PM:** Paratión Metílico, **SPM:** Sin Paratión Metílico, **T:** Tiempo.

#### 3.4.4. Análisis de la expresión diferencial de proteínas

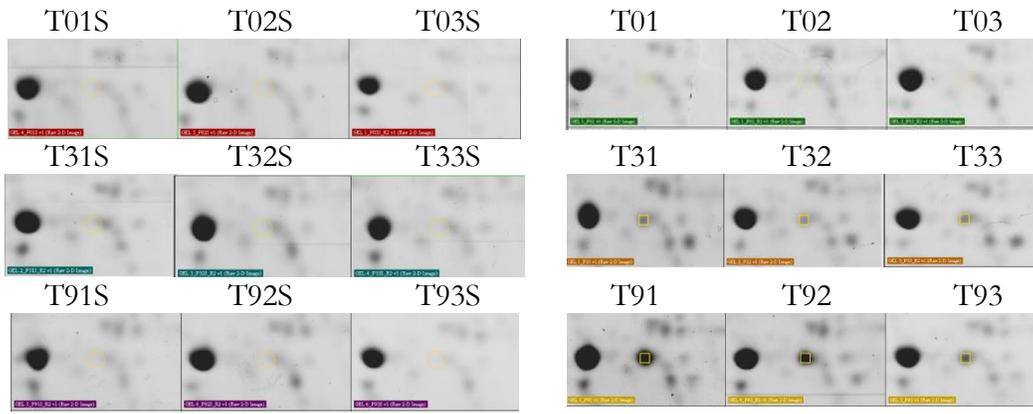
En las siguientes figuras, se muestran cinco spots con expresión diferencial en ambas condiciones experimentales (con y sin plaguicida), los cuales representan gráficamente las proteínas que están involucrados en la degradación de PNF, así como proteínas que tienen la capacidad de defensa de la célula en el daño oxidativo y proteínas para síntesis de aminoácidos.

En la figura 3.2 se muestran los segmentos de los geles correspondientes a los tiempos 0, 3 y 9 horas de los tratamientos sin y con plaguicida respectivamente, que muestran el spot 8004 (Anexo 1), en los cuales se puede observar un incremento en la expresión de la proteína que corresponde a una *Dibidropicolinato reductasa*, pertenece a la ruta de la biosíntesis de L-lisina (Janowski *et al.*, 2010; Anand, 2016). Sin embargo, en el tratamiento sin plaguicida no se observa un incremento.



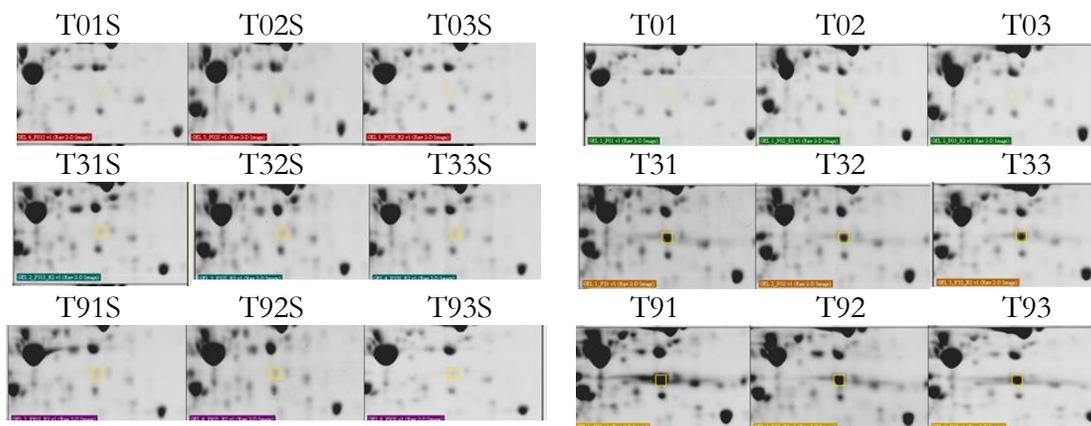
**Figura 3.2.** Spot 8004 en el tratamiento sin y con plaguicida. **T**= Tiempo, el **segundo número (0, 3 y 9)** corresponde a las horas de muestreo, el **tercer número (1, 2 y 3)** corresponde a la repetición y la letra **S** corresponde al tratamiento sin plaguicida.

En la figura 3.3 se muestran los segmentos de los geles correspondientes a los tiempos 0, 3 y 9 horas de los tratamientos sin y con plaguicida respectivamente, en los cuales se puede observar que a partir del tiempo 3 en el tratamiento con plaguicida comienza a incrementar la expresión de la proteína con número de spot 4126 (Anexo 2), la cual se identificó como una **proteína hipotética** con peso molecular de 17,737 Da, sin embargo, mediante un análisis BLASTp de su secuencia este spot corresponde a una *Hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa*, con una identidad del 75% con la de *Paraburkholderia* sp. S27 y un E-value de  $6E^{-84}$  con una cobertura del 98%. Sin embargo, en el tratamiento sin plaguicida no se observa un incremento. Este tiempo se relaciona con la aparición de PNF en la cinética de crecimiento a 50 mg/L.



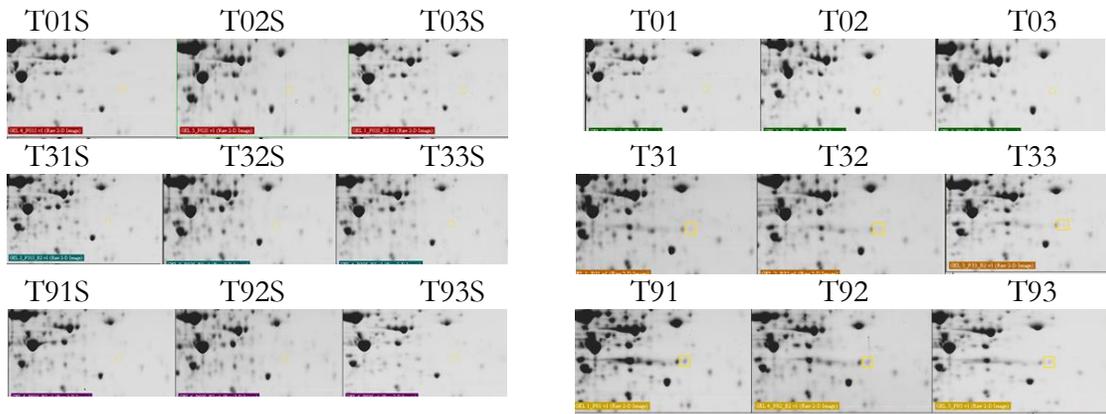
**Figura 3.3.** Spot 4126 en el tratamiento sin y con plaguicida. **T**= Tiempo, el **segundo número (0, 3 y 9)** corresponde a las horas de muestreo, el **tercer número (1, 2 y 3)** pertenece a la repetición y la letra **S** corresponde al tratamiento sin plaguicida.

Asimismo, se encontró una proteína hipotética con un peso molecular de 37,711 Da que corresponde al spot 7224 (Anexo 2), sin embargo, mediante un análisis BLASTp de su secuencia este spot corresponde a una *Hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa* con una identidad del 84% con la de *Burkholderia* sp. yr520 y un E-value de 0.0 con una cobertura del 99%. La cual a partir del tiempo de tres horas en el tratamiento con plaguicida comienza a incrementar su expresión (Figura 3.4). Esta enzima participa en la degradación del benzoato vía hidroxilación y degradación del 1,4-diclorobenceno y clorofenoles (El-Naas *et al.*, 2017). Además de participar en la ruta de degradación del PNF (Liu *et al.*, 2015).



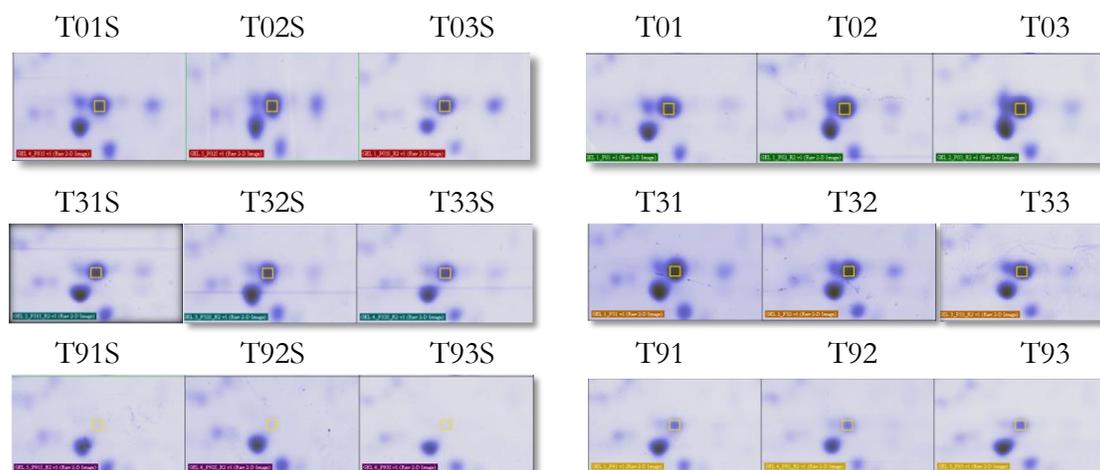
**Figura 3.4.** Spot 7224 en el tratamiento sin y con plaguicida. **T**= Tiempo, el **segundo número (0, 3 y 9)** corresponde a las horas de muestreo, el **tercer número (1, 2 y 3)** pertenece a la repetición y la letra **S** corresponde al tratamiento sin plaguicida.

Adicionalmente, se encontró otras dos proteínas hipotéticas con un peso molecular de 37,712 Da, con número de spot 8218 y 8219 (Anexo 2 y 3), mediante un análisis BLAST<sub>p</sub> de la secuencia estos spots corresponden a una *Hidroquinona 1,2-dioxigenasa* con una identidad del 99% con la de *Bukholderia* sp. SJ98 y un E-value de 0.0 con una cobertura del 100% (Figura 3.5). En el cual se puede observar que a partir del tiempo de tres horas en el tratamiento con plaguicida comienza a incrementar la expresión de las proteínas.



**Figura 3.5.** Spot 8219 en el tratamiento sin y con plaguicida. **T**= Tiempo, el **segundo número (0, 3 y 9)** corresponde a las horas de muestreo, el **tercer número (1, 2 y 3)** corresponde a la repetición y la letra **S** corresponde al tratamiento sin plaguicida.

En la figura 3.6 se muestran los 18 geles bidimensionales con diferencias entre los tratamientos sin plaguicida y con plaguicida del spot número 7112 (Anexo 3), en el cual se presenta una expresión sostenida desde el inicio del cultivo hasta las tres horas, disminuyendo en los cultivos con plaguicida en los tiempos nueve horas y desapareciendo totalmente en los cultivos sin plaguicida en los mismos tiempos, lo que corresponde al agotamiento del PNF en los cultivos. Al identificar la proteína por espectrometría de masas se encontró que es una *peroxirredoxina*, perteneciente a una familia ubicua de enzimas antioxidantes, la cual puede estar ayudando contra el daño oxidativo a la bacteria durante su crecimiento; se ha reportado que esta enzima se expresa en presencia de peróxido de hidrógeno endógeno, exógeno y cuando la cepa se encuentra en estrés general. Por lo que las diferencias en expresión de la proteína podrían estar relacionadas con la presencia del plaguicida (Dubbs y Mongkolsuk, 2007).



**Figura 3.6.** Spot 7112 en geles bidimensionales con y sin plaguicida. **T**= Tiempo, el **segundo número (0, 3 y 9)** corresponde a las horas de muestreo el **tercer número (1, 2 y 3)** pertenece a la repetición y la letra **S** corresponde al tratamiento sin plaguicida.

Con esto se concluye que la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 utiliza las dos rutas de degradación del PNF reportadas la vía de la Hidroquinona (HQ) y la vía del Hidroxiquinol (BT) (Martínez-Ocampo, 2015).

Algunas de las enzimas listadas en la tabla 3.4 están presentes en las vías reportadas de degradación de PNF, sin embargo, enzimas como Oxigenasa y Dioxigenasa bencenotriol han sido descritas para *Pseudomonas putida* y *Burkholderia* sp. SJ98, por lo que es probable que en este estudio es posible identificar algunas de las enzimas reportadas para la degradación de PNF, principalmente aquellas involucradas en la vía BT como fue reportado en *Burkholderia* sp. cepa SJ98 por Chauhan *et al.*, (2010), sin descartar que puedan usar la vía HQ debido a que *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 es una bacteria Gram negativa.

Posteriormente, se realizó una búsqueda bibliográfica para identificar enzimas reportadas con la capacidad de degradar PNF en diferentes organismos. En la tabla 3.4 se muestra información

como género, nombre de la enzima, el punto isoeléctrico, el compuesto al que degradan y el autor y/o autores de los trabajos. Se realizó la búsqueda de las secuencias de aminoácidos en la base de datos en National Center for Biotechnology Information (NCBI), posteriormente se utilizó las bases de datos de ProtParam de ExPASy para calcular los puntos isoeléctricos teóricos de las proteínas. Por lo que con ayuda del PDQuest Advanced 8.0.1 se propone realizar una búsqueda profunda de spots que pudieran corresponder con esta característica.

**Tabla 3.4.** Enzimas involucradas en la degradación de PNF.

Genero	Enzima	GenBank	pI	PM (kDa)	Compuesto	Autor
<i>Pseudomonas putida</i>	Oxigenasa bencenotriol				PNF	Rani y Lalithakumari, 1994
<i>Bacillus sphaericus</i> JS905	Flavoproteína reductasa Oxigenasa	Q6F4M8.1	5.20	59739.0	PNF	Kadiyala y Spain, 1998
<i>Rhodococcus opacus</i> SAO101	1,2-hidroxiquinol dioxigenasa	BAD30043.1	4.56	33199.0	PNF	Kitagawa <i>et al.</i> , 2004
<i>Serratia</i> sp.	Paratión hidrolasa				PM	Pakala <i>et al.</i> , 2007
	p-nitrofenol hidroxilasa componente A				PNF	
<i>Burkholderia</i> sp. SJ98	Dioxigenasa bencenotriol	EKS70306.1	4.89	31988.9	PNF	Chauhan <i>et al.</i> , 2010
<i>Burkholderia</i> sp. AK-5	2-hidroxi-1,4- benzoquinona reductasa	BAI77485.1	5.89	20211.0	Fenoles clorados y Nitrofenoles	Takenaka <i>et al.</i> , 2011
<i>Burkholderia</i> sp. SJ98	Dioxigenasa Hidroxiquinol Maleiacetato reductasa Dehidrogenasa 4- hidroximuconico semialdehido	EKS70671.1	5.97	52174.5	PNF	Vikram <i>et al.</i> , 2012
<i>Arthrobacter</i> sp. JS443	PNF Monooxigenasa	ABL75143.1	5.26	61005.6	PNF	Kallubai <i>et al.</i> , 2015
RhodococcusimtechensisRKJ300	Reductasa	EID81708.1	4.54	37872.7	2-Cloro-4-nitrofenol	Min <i>et al.</i> , 2016
	Oxigenasa	EID77603.1	4.57	34547.8	PNF	
<i>Trametesversicolor</i>	Lacasa				PNF	Levin <i>et al.</i> , 2016

pI= Punto Isoeléctrico teórico (ProtParam)

#### 3.4.5. Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Además de esta búsqueda, se seleccionaron los spots con diferencias en expresión y se cortaron manualmente, se destiñeron, redujeron, alcalizaron, digirieron con Tripsina y fueron extraídos para analizar en MALDI-TOF y se analizaron utilizando el programa MASCOT v2.1.0 y comparadas también con la base de datos del NCBI (Anexos 1-9). En la tabla 3.5 se muestra el nombre de la proteína identificada y función de las 41 proteínas identificadas.

**Tabla 3.5.** Proteínas identificadas de *Burkholderia zhejiangensis*.

NÚMERO DE SPOT	ID GEN	PESO MOLECULAR (Da)	PROTEÍNA	FUNCIÓN	MASCOT SCORE	COBERTURA DE LA SECUENCIA
1102	<a href="#">WP_008351476.1</a>	32,280	NAD (+) Kinasa	La NAD (+) Kinasa (NADK) cataliza la fosforilación de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD+) a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP+) utilizando ATP como donador de fosfato. El NADP+ se reduce a NADPH por deshidrogenasas, en particular glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y las enzimas málicas. NADPH funciona como un cofactor importante en una variedad de vías metabólicas y biosintéticas. NADPH es esencial para la neutralización de los niveles peligrosamente altos de especies de oxígeno reactivo generados por el aumento de la actividad metabólica (Tedeschi et al., 2016).	130	66%
1105	<a href="#">WP_008351350.1</a>	31,111	Succinato-CoAligasa subunidad alfa	Es una enzima que participa en el ciclo de Krebs, cataliza la reacción reversible desde succinato a succinil-CoA. Es una enzima tetramérica compuesta de dos subunidades alfa y dos beta.	58	26%
1108	<a href="#">WP_008342797.1</a>	26,495	Bifuncional dependiente de NADP 3-hidroxiácido deshidrogenasa / 3-hidroxiipropionato deshidrogenasa	Involucrada en el metabolismo de pirimidinas.	79	41%
1114	<a href="#">WP_008342510.1</a>	37,271	UDP-glucosa 4-epimerasa GalE	Es una enzima esencial en el metabolismo de la galactosa, también es conocida como UDP-Glucosa 4-epimerasa (EC 5.1.3.2.) o GALE, es una epimerasa homodimérica encontrada en células bacterianas, fúngicas, plantas y mamíferos	132	37%

NÚMERO DE SPOT	ID GEN	PESO MOLECULAR (Da)	PROTEÍNA	FUNCIÓN	MASCOT SCORE	COBERTURA DE LA SECUENCIA
1123	<a href="#">WP_008352347.1</a>	38,311	Gliceraldehído 3 fosfato reductasa		162	65%
1134	<a href="#">WP_008342883.1</a>	29,112	Orotidina-5'-fosfato descarboxilasa	Es una enzima involucrada en la biosíntesis de pirimidinas.	120	55%
1139	<a href="#">WP_008354244.1</a>	20,975	NAD(P)H:quinon aoxidorreductasa	Esta enzima participa en la biosíntesis de los esteroides.	57	29%
1213	<a href="#">WP_008350851.1</a>	45,685	Glutamato-1-semialdehído-2,1-aminomutasa	Esta enzima participa en la biosíntesis de porfirina y clorofila.	106	35%
1216	<a href="#">WP_008347720.1</a>	40,865	3-deoxi-7-fosfoheptulonato sintasa	Es la primera enzima de la vía del shikimato, es responsable de la biosíntesis de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano.	108	26%
1217	<a href="#">WP_008342779.1</a>	44,019	Acil-CoAdehidrogenasa	Constituyen una familia de flavoproteínas que catalizan la $\alpha,\beta$ -dehidrogenación del ácido graso Acil-CoA (Ghisla y Thorpe, 2004).	73	23%
1305	<a href="#">WP_008342904.1</a>	50,619	Subunidad de biotina carboxilasa de la acetil-CoAcarboxilasa	Es una enzima dependiente de biotina que cataliza la carboxilación irreversible de la Acetil-CoA para producir malonil-CoA a través de sus dos actividades catalíticas, la biotina carboxilasa y la carboxiltransferasa. La función más importante de esta enzima es proporcionar el sustrato de malonil-CoA para la biosíntesis de ácidos grasos.	91	19%
1407	<a href="#">WP_008353714.1</a>	53,328	Dihidropirimidinas a	Es un miembro de la familia de amidohidrolasa cíclica. Esta enzima participa en tres vías metabólicas: metabolismo de las pirimidinas, el metabolismo de betalanina y pantotenato y la biosíntesis de CoA. También es capaz de destoxificar xenobióticos (Huang, 2015).	81	23%

NÚMERO DE SPOT	ID GEN	PESO MOLECULAR (Da)	PROTEÍNA	FUNCIÓN	MASCOT SCORE	COBERTURA DE LA SECUENCIA
1505	<a href="#">WP_008342873.1</a>	73,726	Transcetolasa	Es una enzima de la vía de la pentosa fosfato en todos los organismos (Kim et al., 2012).	73	15%
2126	<a href="#">WP_008352701.1</a>	25,623	Orotatefosforibosiltransferasa	Es una enzima implicada en la biosíntesis de pirimidina. Cataliza la formación de orotidina 5'-monofosfato de orotato y fosforibosilpirofosfato.	103	40%
2129	<a href="#">WP_008345933.1</a>	21,740	Glutación S-transferasa	Es una familia de enzimas que catalizan la conjugación del glutatión endógeno a una variedad de compuestos electrofílicos, protegiendo las macromoléculas biológicas como las proteínas y los ácidos nucleicos de las consecuencias tóxicas de una reacción covalente con el insecticida. Estas enzimas han sido implicadas en la detoxificación y biotransformación de muchos xenobióticos (Díaz et al., 2004; Allocati et al., 2009).	107	48%
2222	<a href="#">WP_008344422.1</a>	36,645	Antranilato fosforibosiltransferasa	Pertenece a la familia de las glicosiltransferasas, específicamente las pentosiltransferasas. Es una enzima que participa en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos.	82	23%
2309	<a href="#">WP_008342624.1</a>	56,109	Proteína hipotética	Es una proteína cuya existencia ha sido predicha, pero para la cual falta evidencia experimental de que se expresa in vivo.	106	24%
2419	<a href="#">WP_008353556.1</a>	60,586	Nucleasa	Es una enzima capaz de escindir los enlaces fosfodiéster entre monómeros de ácidos nucleicos.	159	39%
3127	<a href="#">WP_008350468.1</a>	20,314	Proteína de la familia Phasin	Es una familia pequeña de proteínas encontradas y asociadas con inclusiones en células bacterianas. La mayoría se asocia con inclusiones de polihidroxialcanoato (PHA) (Matsumoto <i>et al.</i> , 2002)	67	26%
3128	<a href="#">WP_008342965.1</a>	28,869	Proteína de división celular ZapD	Son reguladores que modulan la dinámica del anillo FtsZ en el sitio de división celular.	98	44%
3215	<a href="#">WP_008347250.1</a>	40,725	Porina	Son proteínas que actúan como un poro, a través de las moléculas pueden difundirse.	54	14%

NÚMERO DE SPOT	ID GEN	PESO MOLECULAR (Da)	PROTEÍNA	FUNCIÓN	MASCOT SCORE	COBERTURA DE LA SECUENCIA
3324	<a href="#">WP_033537244.1</a>	38,054	Subunidad alfa fenilalanina-ARNtligasa	Esta enzima participa en la biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano y biosíntesis de aminoacyl-ARNt.	80	20%
3528	<a href="#">WP_008346921.1</a>	58,560	Isocitratoliasa	Es una enzima del ciclo del glioxilato que cataliza la escisión del isocitrato en succinato y glioxilato. Junto con la malato sintasa, elimina las dos etapas de descaboxilación del ciclo del ácido tricarbóxico.	80	15%
4126	<a href="#">WP_033536619.1</a>	17,737	Proteína hipotética	Las proteínas hipotéticas fueron descubiertas a finales de 1990, de las cuales no se conoce información, con excepción de sus secuencias de aminoácidos.	92	44%
4130	<a href="#">WP_008353900.1</a>	28,405	Regulador transcripcional de la familia GntR	GntR es un factor de transcripción presente en bacterias y que regulan diversos procesos biológicos (Suvorova <i>et al.</i> , 2015).	91	45%
5106	<a href="#">WP_008342714.1</a>	21,556	Superóxido dismutasa	Esta enzima cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Debido a esto es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno.	88	54%
5128	<a href="#">WP_008344416.1</a>	20,700	NADH-azoreductasa dependiente de FMN	Cataliza la escisión reductora del enlace azo en compuestos aromáticos a las correspondientes aminas. Requiere NADH, pero no NADPH, como donante de electrones para su actividad.	54	25%
5502	<a href="#">WP_008341880.1</a>	62,108	CTP sintetasa	Es una enzima involucrada en la biosíntesis de pirimidina que interconvierte citidinatrifosfato (CTP) y Uridino-5'-trifosfato (UTP).	71	13%
6312	<a href="#">WP_008342775.1</a>	45,974	Quinureninasa	Es una enzima dependiente de fosfato púridoxal que cataliza la escisión de la quinurerina en el ácido antranílico. También es parte del metabolismo del triptófano.	73	19%
6421	<a href="#">WP_008341793.1</a>	55,856	2-isopropilmalato sintasa	Es una enzima que pertenece a la familia de transferasas que convierten los grupos acilo en grupos alquilo en la transferencia.	79	17%

NÚMERO DE SPOT	ID GEN	PESO MOLECULAR (Da)	PROTEÍNA	FUNCIÓN	MASCOT SCORE	COBERTURA DE LA SECUENCIA
7112	<a href="#">WP_008352971.1</a>	20,994	Peroxirredoxina	Son una ubicua familia de enzimas antioxidantes que desempeñan un papel en la reducción de un amplio espectro de peróxidos y se encuentra en una amplia gama de organismos como las bacterias. La enzima requiere la presencia de un intermediario tiólico, como la tiorredoxina como cofactor reductor (Rhee et al., 2001; Wood et al., 2003; Aran et al., 2009; Fernández y De la paz, 2016).	140	67%
7132	<a href="#">WP_008344142.1</a>	15,626	Fosforibosil-AMP ciclohrolasa	Esta enzima pertenece a la familia de las hidrolasas, participa en el metabolismo de la histidina.	59	18%
7224	<a href="#">WP_033536618.1</a>	37,711	Proteína hipotética	Las proteínas hipotéticas fueron descubiertas a finales de 1990, de las cuales no se conoce información, con excepción de sus secuencias de aminoácidos.	155	55%
7307	<a href="#">WP_008351360.1</a>	37,900	Recombinasa RecA	RecA tiene múltiples funciones, todas relacionadas con la reparación del ADN.	69	42%
7319	<a href="#">WP_008351353.1</a>	41,467	Succinato formador de ADP-subunidad beta de CoAligasa	Es una enzima mitocondrial que actúa como heterodímero, está compuesta por una subunidad alfa invariante y una subunidad beta específica del sustrato. Funciona en el ciclo del ácido cítrico.	153	41%
8004	<a href="#">WP_008350762.1</a>	18,234	Proteína YbhB/YbcL familia Rafcinasa tipo inhibidor	Son proteínas que se encuentran en el citoplasma y el periplasma de bacterias. Podrían estar involucradas en la inhibición de la fosforilación de proteínas por las cinasas (Serre <i>et al.</i> , 2001).	86	71%

NÚMERO DE SPOT	ID GEN	PESO MOLECULAR (Da)	PROTEÍNA	FUNCIÓN	MASCOT SCORE	COBERTURA DE LA SECUENCIA
8103	<a href="#">WP_008352971.1</a>	20,994	Peroxirredoxina	Son una ubicua familia de enzimas antioxidantes que desempeñan un papel en la reducción de un amplio espectro de peróxidos y se encuentra en una amplia gama de organismos como las bacterias. La enzima requiere la presencia de un intermediario tiólico, como la tiorredoxina como cofactor reductor (Rhee et al., 2001; Wood et al., 2003; Aran et al., 2009; Fernández y De la paz, 2016).	82	50%
8150	<a href="#">WP_008352971.1</a>	20,994	Peroxirredoxina	Son una ubicua familia de enzimas antioxidantes que desempeñan un papel en la reducción de un amplio espectro de peróxidos y se encuentra en una amplia gama de organismos como las bacterias. La enzima requiere la presencia de un intermediario tiólico, como la tiorredoxina como cofactor reductor (Rhee et al., 2001; Wood et al., 2003; Aran et al., 2009; Fernández y De la paz, 2016).	74	53%
8218	<a href="#">WP_033536888.1</a>	37,712	Proteína hipotética	Las proteínas hipotéticas fueron descubiertas a finales de 1990, de las cuales no se conoce información, con excepción de sus secuencias de aminoácidos.	88	37%
8219	<a href="#">WP_033536888.1</a>	37,712	Proteína hipotética	Las proteínas hipotéticas fueron descubiertas a finales de 1990, de las cuales no se conoce información, con excepción de sus secuencias de aminoácidos.	72	17%
8501	<a href="#">WP_008342379.1</a>	62,167	30S proteína ribosomal S1	S1 es una proteína ribosómica atípica débilmente asociada con la subunidad 30S que ha sido implicada en la traducción, la transcripción y el control de la estabilidad del ARN.	53	13%

Las proteínas con número de spot 4126 y 7224 se identificaron como una proteína hipotética de 17,737 Da (ID). Se realizó un análisis BLASTp de su secuencia, arrojando como resultado una *Hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa* con una identidad del 75% con la de *Paraburkholderia* sp. S27 (E-value de  $6E^{-84}$  y cobertura del 98%). Esta enzima está implicada en la ruta de degradación de PNF de las Gram positivas, y realiza la bioconversión de hidroxiquinol a maleilacetato. Esta proteína incrementa sus niveles de expresión en presencia de PM a partir de las tres horas

Por otro lado, el spot con número 8219, también se identificó como proteína hipotética (WP\_033536888.1) con un peso molecular de 37,712 Da, por lo que, al igual que para el spot anterior, se realizó un análisis BLASTp de la secuencia de este spot, revelando que corresponde a una *Hidroquinona 1,2-dioxigenasa* con una identidad del 99% con la de *Burkholderia* sp. SJ98 (E-value de 0.0, cobertura del 100%). Esta enzima cataliza la conversión de hidroquinona a 4-hidroximucónico semialdehído en la ruta de degradación de PNF en Gram negativas. En los geles de 2D se pudo observar que esta proteína incrementa su expresión a partir del tiempo tre horas en presencia de PM.

Sin embargo, no se identificó la proteína denominada *p-nitrofenol monooxigenasa II* la cual es la enzima responsable de la primera y segunda reacción de la ruta Bencenotriol, así como las proteínas de la ruta de la Hidroquinona realizada por bacterias Gram negativas, aunque, si se encontraron los genes que codifican para la ruta de la Hidroquinona (Capítulo 2). A pesar de esto, se confirma que la bacteria es capaz de realizar la degradación del metabolito PNF por las dos rutas reportadas. Esto coincide con lo reportado con Popoca-Ursino (2017) donde menciona que la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 utiliza ambas vías de degradación simultáneamente, debido a la identificación de intermediarios en la ruta de degradación del PM que generalmente utilizan las bacterias Gram negativas e intermediarios de la ruta de degradación que utilizan las bacterias Gram positivas.

Vikram *et al.* (2012) también menciona que *Burkholderia* sp. SJ98 presenta los genes involucrados en la ruta de degradación del PNF que utilizan las bacterias Gram negativas (Hidroquinona). Sin embargo, en este estudio solo encontraron de manera parcial la ruta Bencenotriol o Hidroxiquinol de las bacterias Gram positivas al identificar el gen *pnpC* (Hidroxiquinol 1-2 Dioxigenasa), por lo que se propone que la bacteria utiliza ambas vías.

Tiwari *et al.* (2018) reportan que las enzimas fructosa 1,6-bifosfatasa, fructosa bifosfato aldolasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa fueron reguladas negativamente bajo el estrés del paratión metílico en la cianobacteria *Fischerella* sp. Sin embargo, en este trabajo se encontraron la fructosa-bisfosfato aldolasa clase I y clase II (las cuales son enzimas que participan en la glucólisis), que fueron encontradas como subexpresadas en la condición con PM. Además, encontramos glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (la cual participa en la vía de las pentosas fosfato) y peroxirredoxinas, estas dos últimas están reportadas para proteger del daño oxidativo.

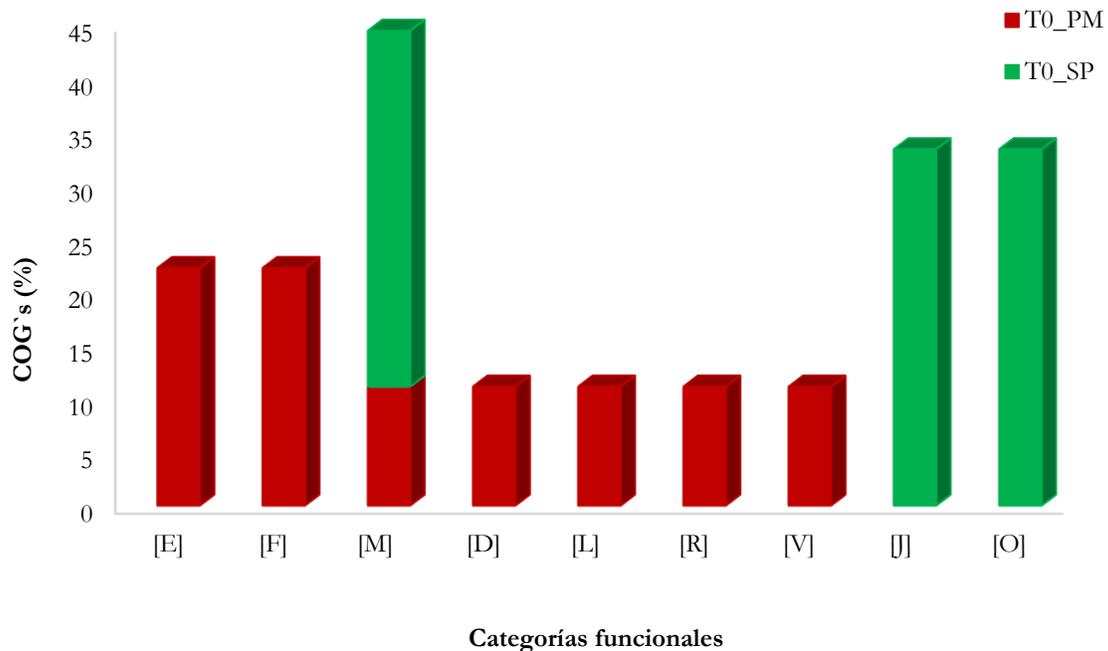
También se identificaron oxidorreductasa que podrían estar involucradas en proteger a la cepa del plaguicida PM, como lo que reportan Wang *et al.* (2008), que las oxidorreductasas están relacionadas para proteger *P. putida* KT2440 de contaminantes. Asimismo, se identificó una hidrolasa, la cual se encuentra en diferentes cepas bacterianas aisladas de suelos, y está reportada con la capacidad de utilizar como fuente de carbono a plaguicidas organofosforados y degradarlos (Siddavattam *et al.*, 2006).

#### **3.4.6. Anotación funcional por COG's**

Las proteínas identificadas se clasificaron de acuerdo a los COG's, para identificar si éstas participan en diversas funciones o bien si estas se distribuyen en un reducido número de categorías.

En el tiempo cero, en la condición experimental en presencia de PM, se observaron 10 proteínas de las cuales 9 presentaron COG's representando el 90% y el 10% no se agrupó en ninguna categoría. Las principales categorías, de acuerdo al número de proteínas fueron [E]: transporte y metabolismo de aminoácidos con tres proteínas y representando el 22.2%, la [F]: transporte y metabolismo de nucleótidos representado con dos elementos (22.2%), una proteína para [M]: biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana, la categoría [D]: Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica, [L]: replicación, recombinación y reparación, [R]: solo predicción de función general y la categoría [V]: mecanismos de defensa, cada una representada con el 11.1%. La categoría funcional que solo se comparte con la condición sin PM es la categoría [M]: biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana.

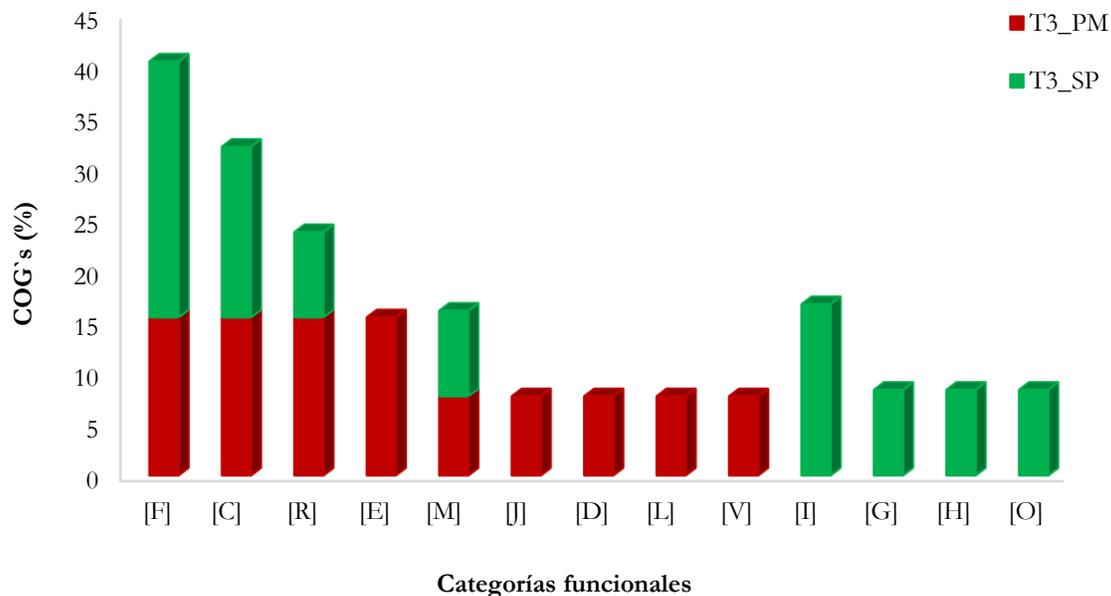
Por otra parte, en el tiempo cero en ausencia de PM, se observaron cuatro proteínas de las cuales tres presentaron COG's representando el 75% y una proteína no se agrupó a ninguna categoría representando el 25%. Las principales categorías, de acuerdo al número de proteínas, fueron [M]: biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana, [J]: traducción, estructura ribosomal y biogénesis, y [O]: modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas representada cada una con el 33.3% (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** Categorías funcionales del tiempo cero horas en presencia y ausencia de PM.

En la condición experimental con PM, pero del tiempo tres horas, se obtuvieron 18 proteínas de las cuales solo 12 se agruparon en 9 COG's representando el 66.7%, y el 33.3% con siete proteínas no se agruparon a ninguna categoría. Las principales categorías fueron la [F]: transporte y metabolismo de nucleótido, [C]: producción y conversión de energía, [R]: solo predicción de función general, [E]: transporte y metabolismo de aminoácidos, cada una con dos proteínas y representando el 15.4% cada una y la categoría [M]: biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana representada con una proteína (7.7%). Las categorías que solo fueron encontrados en este tiempo y en esta condición fueron la categoría [E]: transporte y metabolismo de aminoácidos (15.4%), [J]: traducción, estructura ribosomal y biogénesis, [D]: Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica, [L]: replicación, recombinación y reparación y [V]: mecanismos de defensa, representan el 7.7% (una proteína cada una).

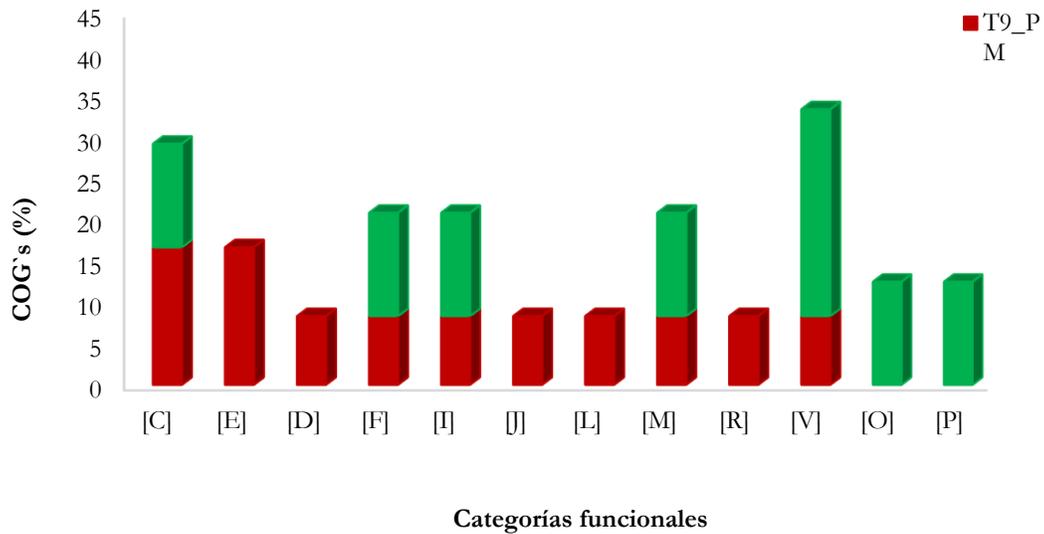
En el mismo tiempo, pero sin PM se obtuvieron 12 proteínas las cuales todas presentaron COG´s (Figura 3.8). Las cinco principales categorías fueron: [F]: transporte y metabolismo de nucleótido, representada con tres proteínas (25%), las categorías [C]: producción y conversión de energía e [I]: transporte y metabolismo de lípidos se encuentran representadas con dos proteínas (16.7%). La categoría [R]: solo predicción de función general y [M]: biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana se encuentran representadas con una proteína y 8.3% cada una. Los COG´s que solo fueron encontrados en el tiempo tres horas y en la condición sin PM fueron [I]: transporte y metabolismo de lípidos con dos proteínas (16.7%), [G]: transporte y metabolismo de carbohidratos, [H]: transporte y metabolismo de la coenzima y [O]: modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas, representadas con una proteína (8.3% cada una).



**Figura 3.8.** Categorías funcionales del tiempo tres horas en presencia y ausencia de PM.

Como se muestra en la figura 3.9, en un tiempo de nueve horas la condición experimental con PM, de las 18 proteínas 12 presentaron COG's representando el 66.7% y el 33.3% no se agrupó en ningún COG. En esta condición se encontró la categoría funcional [C]: producción y conversión de energía y la categoría [E]: transporte y metabolismo de aminoácidos, con dos proteínas y representada con el 16.7% cada una. Seguidas de la categoría [D] denominada control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica, [F]: transporte y metabolismo de nucleótido, [I]: transporte y metabolismo de lípidos, [J]: traducción, estructura ribosomal y biogénesis, [L]: replicación, recombinación y reparación, [M]: biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana, [R]: solo predicción de función general, [V]: mecanismos de defensa, estas categorías fueron representadas con una proteína y con el 8.3% cada una.

Sin embargo, en la condición sin PM y en el mismo tiempo se obtuvieron ocho proteínas las cuales todas presentaron COG's y se encuentran representadas en siete categorías funcionales, las que destacan [C] de producción y conversión de energía, [F] denominada transporte y metabolismo de nucleótido, [I]: transporte y metabolismo de lípidos, [M]: biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana, representadas con una proteína y con el 12.5% cada una y el COG [V]: mecanismos de defensa (25.0%). Por otro lado, las categorías que solo se presentaron en este tiempo y en esta condición fueron la categoría [O]: modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas, y [P]: transporte y metabolismo de iones inorgánicos, representadas con una proteína y con el 12.5% cada una.



**Figura 3.9.** Categorías funcionales del tiempo nueve horas en presencia y ausencia de PM.

En la tabla 3.6 se muestran las principales categorías funcionales en los tres tiempos a las cero, tres y nueve horas, así como en las dos condiciones experimentales con y sin PM. En los tres tiempos con PM se comparte la categoría funcional [E] de transporte y metabolismo de aminoácidos, [F] de transporte y metabolismo de nucleótidos y [C] de producción y conversión de energía. En la condición sin PM la categoría funcional [M] biogenesis de la envoltura, pared celular y membrana es la que se comparte en los tres tiempos.

**Tabla 3.6.** Resumen de los resultados de las categorías funcionales.

Tiempo de muestreo y tratamiento	Principales categorías (COG)	Definición	No. GED	%
<b>Cero horas, sin PM</b> Total =4 proteínas, 3 proteínas agruparon en COG's (75%); una sin agruparse (25%)	[M]	Biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana	1	33.3
	[J]	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	1	33.3
	[O]	Modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas	1	33.3
<b>Cero horas, con PM</b> Total = 10 proteínas, 9 agruparon en COG's (90%); una sin agruparse (10%)	[E]	Transporte y metabolismo de aminoácidos	2	22.2
	[F]	Transporte y metabolismo de nucleótidos	2	22.2
	[M]	Biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana	1	11.1
	[D]	Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica	1	11.1
	[L]	Replicación, recombinación y reparación	1	11.1
<b>Tres horas, sin PM</b> Total =12 proteínas, 12 proteínas agruparon en COG's (100%)	[F]	Transporte y metabolismo de nucleótidos	3	25.0
	[C]	Producción y conversión de energía	2	16.7
	[I]	Transporte y metabolismo de lípidos	2	16.7
	[R]	Solo predicción de función general	1	8.3
	[M]	Biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana	1	8.3
<b>Tres horas, con PM</b> Total = 18 proteínas, 12 agruparon en COG's (66.7%); 6 sin agruparse (33.3%)	[F]	Transporte y metabolismo de nucleótidos	2	15.4
	[C]	Producción y conversión de energía	2	15.4
	[R]	Solo predicción de función general	2	15.4
	[E]	Transporte y metabolismo de aminoácidos	2	15.4
	[M]	Biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana	1	7.7
<b>Nueve horas, sin PM</b> Total = 8 proteínas, 7 proteínas agruparon en COG's (87.5%)	[C]	Producción y conversión de energía	1	12.5
	[F]	Transporte y metabolismo de nucleótidos	1	12.5
	[I]	Transporte y metabolismo de lípidos	1	12.5
	[M]	Biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana	1	12.5
	[V]	Mecanismos de defensa	2	25.0
<b>Nueve horas, con PM</b> Total = 18 proteínas, 12 agruparon en COG's (66.7%); 6 sin agruparse (33.3%)	[C]	Producción y conversión de energía	2	16.7
	[E]	Transporte y metabolismo de aminoácidos	2	16.7
	[D]	Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica	1	8.3
	[F]	Transporte y metabolismo de nucleótidos	1	8.3
	[I]	Transporte y metabolismo de lípidos	1	8.3

El COG [E] de transporte y metabolismo de aminoácidos fue uno de los más representados en los tres tiempos, pero exclusivamente en la condición con PM. Se obtuvo la *proteína Antranilato fosforibosiltransferasa* la cual participa en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano y fenilalanina). Asimismo, se encontró la proteína denominada *Quinureninasa* reportada como parte del metabolismo del triptófano para generar alanina y acetil-CoA. Por lo tanto, estos resultados demuestran la presencia de aminoácidos glucogénicos, es decir aquellos esqueletos de carbono que se degradan a piruvato,  $\alpha$ -cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato u oxalacetato, y son, por lo tanto, precursores de la glucosa. También, se encuentran aminoácidos cetogénicos, cuyos esqueletos de carbono son degradados a acetil-CoA o acetoacetato y pueden ser convertidos a ácidos grasos o cuerpos cetónicos.

Otro COG representado es el [F] de transporte y metabolismo de nucleótidos, en el cual están implicadas proteínas en la biosíntesis de pirimidinas y purinas en las dos condiciones experimentales. Las proteínas identificadas en la condición con PM fueron *Orotato fosforibosil transferasa* la cual es una enzima implicada en la biosíntesis de pirimidina. Cataliza la formación de orotidina 5'-monofosfato de orotato y fosforibosilpirofosfato, y la proteína CTP sintetasa involucrada en la biosíntesis de pirimidina que interconvierte citidinatrifosfato (CTP) y Uridino-5'-trifosfato (UTP). Por otro lado, en la condición sin PM se identificó una NAD (+) Cinasa, la cual cataliza la fosforilación de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP<sup>+</sup>) utilizando ATP como donador de fosfato. El NADP<sup>+</sup> se reduce a NADPH por deshidrogenasas, en particular glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y las enzimas málicas. NADPH funciona como un cofactor importante en una variedad de vías metabólicas y biosintéticas. NADPH es esencial para la neutralización de los niveles peligrosamente altos de especies de oxígeno reactivo generados por el aumento de la actividad metabólica (Tedeschi *et al.*, 2016). *Orotidina-5'-fosfato descarboxilasa*, enzima involucrada en la biosíntesis de pirimidinas y la proteína *Dihidropirimidinasa*, es miembro de la familia de amidohidrolasa cíclica. Esta enzima participa el metabolismo de las pirimidinas, el metabolismo

de beta-alanina y pantotenato y la biosíntesis de CoA. También es capaz de detoxificar xenobióticos (Huang, 2015).

En la condición con PM y en el COG [C] de producción y conversión de energía, se encontraron proteínas como *Isocitratoliasa* la cual participan en el ciclo del glioxilato y la proteína *NADH-azoreductasa dependiente de FMN* que cataliza la escisión reductora del enlace azo en compuestos aromáticos. Proteína como la *NAD(P)H: quinona oxidoreductasa* involucradas en la biosíntesis de esteroides.

En las dos condiciones experimentales se encontró la categoría funcional [M] de Biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana. Identificando una *Porina* las cuales son proteínas que actúan como un poro, a través de las moléculas pueden difundirse.

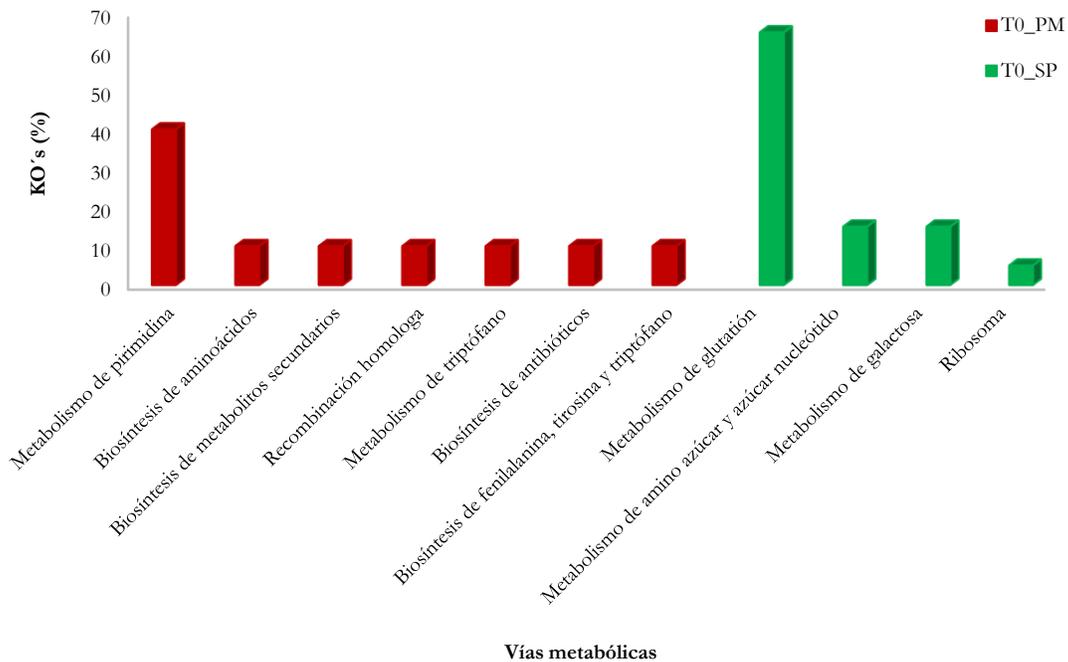
Asimismo, se encontró la presencia de la categoría funcional [V] la cual se refiere a mecanismos de defensa, donde se identificó la proteína como una *peroxirredoxina*, perteneciente a una familia ubicua de enzimas antioxidantes, la cual puede estar ayudando contra el daño oxidativo a la bacteria durante su crecimiento (Dubbs y Mongkolsuk, 2007).

#### **3.4.7. Análisis de la función de las proteínas utilizando Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)**

Para ubicar en las vías metabólicas a cada una de las proteínas identificadas por MALDI-TOF, se utilizó la utilidad *KEGG Pathway Color*. De las 41 proteínas identificadas, 28 se ubicaron mediante este programa, estas representan el 68.3%. Fue utilizada *Burkholderia sp.* RPE67 con el código de organización “bue” como cepa de referencia. En el tiempo de cero horas y en la condición con PM el 19.5% presentaron KO’s, mientras que para el tiempo tres y nueve horas se presentaron el 26.8% para cada uno. Por otro lado, en la condición experimental sin PM y del tiempo de cero horas se presentaron el 7.3%, 29.3% en el tiempo de tres horas y 19.5% para el tiempo de nueve horas.

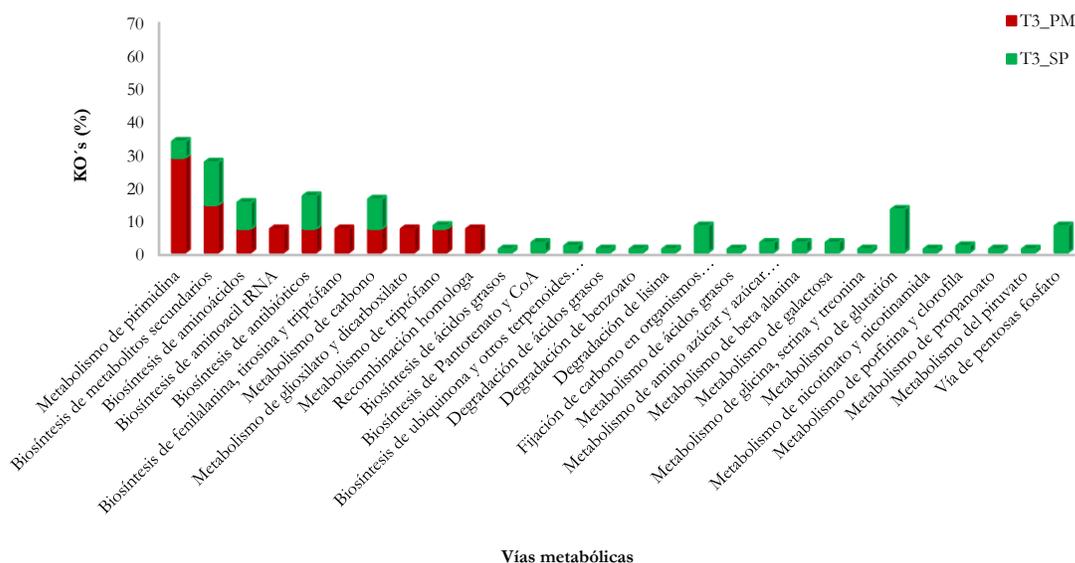
Las proteínas de las cero horas y en presencia de PM fueron ubicadas en vías metabólicas únicas de 1. Metabolismo de pirimidina (40%), 2. Biosíntesis de aminoácidos, 3. Biosíntesis de metabolitos secundarios, 4. Recombinación homologa, 5. Metabolismo de triptófano, 6. Biosíntesis de antibióticos y 7. Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano representadas cada una con el 10%.

En cambio, en la condición control (Sin PM) las vías metabólicas únicas fueron: 1. Metabolismo de glutatión (65%), 2. Metabolismo de amino azúcar y azúcar nucleótido, 3. Metabolismo de galactosa, representando estas dos 15% cada una, y 4. Ribosoma representada con el 5% (Figura 3.10).



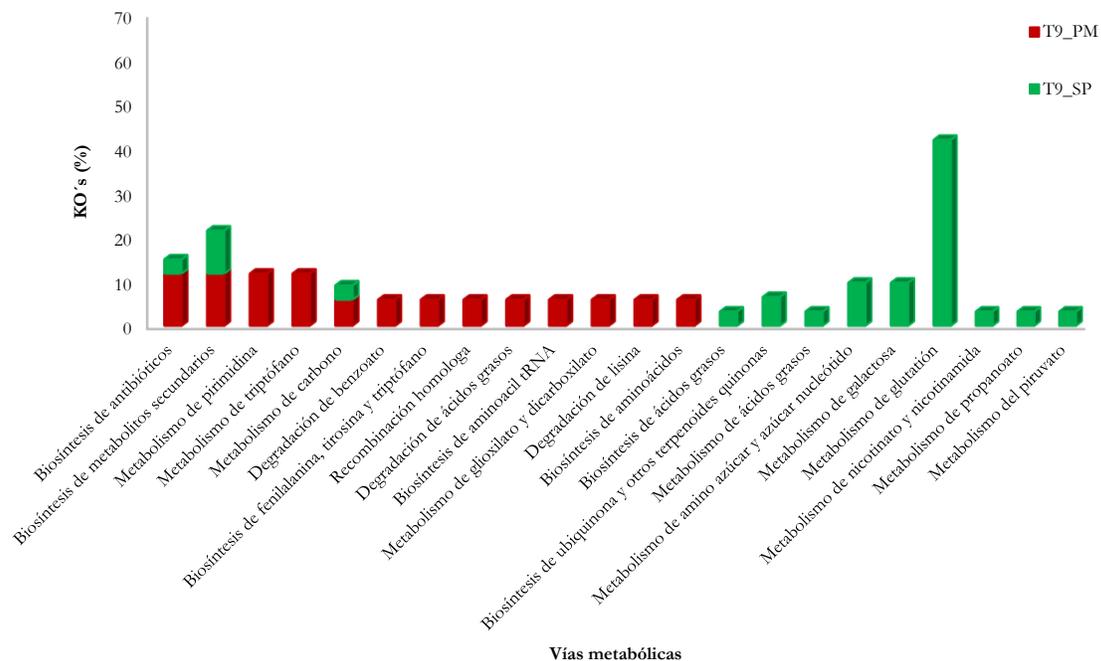
**Figura 3.10.** Distribución de proteínas de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en KEGG en el tiempo de cero horas.

Para las tres horas, las vías metabólicas únicas para la condición con PM fueron: 1. Biosíntesis de aminoacil tRNA, 2. Metabolismo de fenilalanina, tirosina y triptófano, 3. Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato y 4. Recombinación homologa representadas cada una con el 7.1%. Mientras que en la condición sin PM las vías metabólicas únicas fueron: 1. Metabolismo del glutatión (13%), 2. Fijación de carbono en organismos fotosintéticos, 3. Vía de pentosas fosfato representadas cada una con el 8%. 4. Biosíntesis de Pantotenato y CoA, 5. Metabolismo de amino azúcar y azúcar nucleótido, 6. Metabolismo de beta alanina, 7. Metabolismo de galactosa representadas con el 3% cada una. 8. Biosíntesis de ubiquinona y otros terpenoides quinonas, 9. Metabolismo de porfirina y clorofila representada cada una con el 2%, 10. Biosíntesis de ácidos grasos, 11. Degradación de ácidos grasos, 12. Degradación de benzoato, 13. Degradación de lisina, 14. Metabolismo de ácidos grasos, 15. Metabolismo de glicina, serina y treonina, 16. Metabolismo de nicotinato y nicotinamida, 17. Metabolismo de propanoato y 18. Metabolismo del piruvato representadas cada una con el 1% (Figura 3.11).



**Figura 3.11.** Distribución de proteínas de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en KEGG en el tiempo de tres horas.

Por último, para el tiempo nueve horas las vías metabólicas únicas para la condición con PM fueron: 1. Metabolismo de pirimidina, 2. Metabolismo de triptófano cada una representada con el 11.8%, 3. Degradación de benzoato, 4. Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano, 5. Recombinación homóloga, 6. Degradación de ácidos grasos, 7. Biosíntesis de aminoacil tRNA, 8. Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato, 9. Degradación de lisina y 10. Biosíntesis de aminoácidos representada con el 5.9% cada una de las vías mencionadas. Mientras que en la condición sin PM las vías metabólicas únicas fueron: 1. Metabolismo de glutatión (41.9%), 2. Metabolismo de amino azúcar y azúcar nucleótido, 3. Metabolismo de galactosa, representada cada una de las vías con el 9.7%, 4. Biosíntesis de ubiquinona y otros terpenoides quinonas (6.5%), 5. Biosíntesis de ácidos grasos, 6. Metabolismo de ácidos grasos, 7. Metabolismo de nicotinato y nicotinamida, 8. Metabolismo de propanoato, 9. Metabolismo del piruvato, cada una representada con el 3.2% (Figura 3.12).



**Figura 3.12.** Distribución de proteínas de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3en KEGG en el tiempo de nueve horas.

Kuo y Tang (1998) reportan que la vía de las pentosas fosfato se estimula bajo condiciones de estrés oxidativo causado por el paraquat. Sin embargo, en el estudio de Lu *et al.* (2013) reportan el análisis de transcriptoma de *E. coli* expuesto a glifosato e incapaz de crecer en presencia de este herbicida organofosforado a 200 mM. Estos resultados sugieren que el herbicida inhibe varias enzimas clave del metabolismo central de carbono como la vía de pentosas fosfato, el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), glioxilato y la gluconeogénesis, lo cual reduce la capacidad glucolítica. En comparación con este trabajo no se encontraron representadas la vía de pentosas fosfato, el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), pero si se encontró representada en la condición con PM el metabolismo de glioxilato y dicarboxilato en el tiempo tres y nueve horas. El ciclo del glioxilato es una variante del ciclo del ácido cítrico, la cual permite generar glucosa a partir de ácidos grasos y es necesaria para el desarrollo de la cepa.

Gao *et al.* (2017) reportan un análisis proteómico con un bactericida denominado Fubianezuofeng, con el que las proteínas expresadas diferencialmente se enriquecieron para el metabolismo de pirimidina. En este trabajo también se encontró sobrerrepresentado el metabolismo de pirimidinas en la condición con PM, que puede ser debido al daño oxidativo que puede estar causando el PNF a los ácidos nucleicos, se requiere producir estas bases nitrogenadas (citosina, tiamina y uracilo) para la generación de nuevos nucleótidos.

Chakka *et al.* (2015) muestran el análisis transcripcional de *E. coli*, la cual expresa un marco de lectura abierto (Orf306) ubicado cerca del gen *oph* del plásmido pPDL2 de la cepa *Sphingobium fuliginis* ATCC 27551 y en presencia de PNF como única fuente de carbono. Este gen codifica para una hidrolasa de organofosforados. Esta expresión del Orf306 sobreexpresa genes que codifican para el catabolismo de carbono alternativo, el propionato, el glioxilato y el ciclo del metilcitrato. Además, menciona que una tendencia similar se observó en los datos de proteómica. En este trabajo el metabolismo de glioxilato y dicarboxilato se encuentra presente en el tiempo tres y nueve horas, pero sobrerrepresentada en el tiempo tres horas donde se encuentra la

máxima concentración de PNF. Para el caso del metabolismo de carbono se encuentra en las dos condiciones experimentales en el tiempo tres y nueve horas.

Por otra parte, se encontró solo en la condición sin PM sobrerrepresentado el metabolismo de galactosa, la cual está involucrada en la transformación de galactosa en glucosa a través de una serie de reacciones que conforman la vía de Leloir. Adicionalmente, la glucosa-1-fosfato es transformada en glucosa-6-fosfato, que entra a la vía de la glucólisis para ser metabolizada y generar energía para el desarrollo de la cepa. Asimismo, se encontró sobrerrepresentado el metabolismo del glutatión. El glutatión (GSH) es un tripéptido formado por glutamato (Glu), Cisteína (Cys) y Glicina (Gly) con un enlace tipo  $\gamma$  entre los dos primeros aminoácidos. Es el principal compuesto tiólico no proteico presente en bacterias, hongos, plantas y animales. Se encuentra en un rango de concentración entre 1-10 mM y se presenta en su forma reducida. Su principal función es como molécula antioxidante en el *mantenimiento de la homeostasis celular redox*, pero además desempeña otras múltiples funciones como la *formación de desoxirribonucleótidos precursores del ADN*; *transporte y almacenamiento de ciertos aminoácidos* como la cisteína; *detoxificación de compuestos xenobióticos y otros agentes tóxicos*, el GSH es capaz de conjugarse con xenobióticos como los plaguicidas, los conjugados son mas solubles y por lo tanto, menos tóxicos, lo que facilita la expulsión de la célula, así mismo, las moléculas de GSH se unen a cationes metálicos ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Cu}^{2+}$ ), inmovilizándolos e impidiendo que interaccionen con estructuras y moléculas biológicas y por lo tanto, que puedan ejercer sus efectos tóxicos; y finalmente otra función es la *Detoxificación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS, NOS)* lo cual evitan una situación celular de estrés oxidativo.

Otras vías representadas en la condición sin PM fue el metabolismo de propanoato se encontró en el tiempo tres y nueve horas. Esta vía puede estar involucrada en la gluconeogénesis, es decir en la producción de azúcar a partir sustancias diferentes a los carbohidratos (propionato), y la vía de las pentosas fosfato sobrerrepresentada en el tiempo de tres horas, la cual es necesaria para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.

### 3.5. CONCLUSIONES

- El plaguicida PM y el PNF son compuestos que inducen a la cepa a una expresión diferencial de proteínas involucradas en el proceso de degradación.
- La Metodología utilizada permitió identificar 41 proteínas.
- La bacteria es capaz de degradar el PNF por las dos rutas reportadas, debido a que se identificó la proteína *Hidroquinona 1-2-Dioxigenasa* la cual es una enzima que participa en la ruta Hidroquinona de bacterias Gram negativas, además se identificó la proteína *Hidroxiquinol 1-2-Dioxigenasa* la cual participa en la ruta Hidroxiquinol de las bacterias Gram positivas.
- Se identificaron proteínas sobreexpresadas en la condición con PM, como *peroxirredoxinas*, las cuales juegan un papel como enzimas antioxidantes, las cuales pueden estar ayudando contra el daño oxidativo a la bacteria. Además de NAD (+) Cinasas las cuales pueden estar neutralizando especies reactivas de oxígeno.
- A las tres horas, que es el punto en el cual el PNF se encuentra a su máxima concentración, se produjo la mayor expresión exclusiva de proteínas.
- Se observa que, en la condición con PM en los tres tiempos, la mayor expresión de proteínas pertenece al COG [E] referente al transporte y metabolismo de aminoácidos, y al COG [C] de producción y conversión de energía. Lo que demuestra la falta de glucosa, y la presencia de PM, permite a la bacteria la producción de ATP a través de vías alternativas.
- Los resultados de KEGG muestran vías metabólicas como la de la degradación de benzoato y el metabolismo de glioxilato y dicarboxilato presentes en la condición con PM, las cuales fortalecen el modelo de degradación de la cepa debido a que utilizan el plaguicida como fuente de carbono.

### 3.6. LITERATURA CONSULTADA

- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., & Di Ilio, C. (2009). Glutathione transferases in bacteria. *Febs Journal*, 276(1), 58-75.
- Anand, V. (2016). Cloning overexpression purification and characterization of DAPB gene encoding dihydrodipicolinate reductase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.
- Aran, M., García, S. M., Rimmaudo, L., & Wolosiuk, R. A. (2009). Reevaluación de los residuos cisteína en el señalamiento redox. *Química Viva*, 8(3), 162-184.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Chakka, D., Gudla, R., Madikonda, A. K., Pandeti, E. V. P., Parthasarathy, S., Nandavaram, A., & Siddavattam, D. (2015). The organophosphate degradation (opd) island borne esterase induced metabolic diversion in *E. coli* and its influence on p-nitrophenol degradation. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M115.
- Chakraborty, R., Wu, C. H., & Hazen, T. C. (2012). Systems biology approach to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 483-490.
- Chauhan, A., & Jain, R. K. (2010). Biodegradation: gaining insight through proteomics. *Biodegradation*, 21(6), 861-879.
- Chauhan, A., Pandey, G., Sharma, N. K., Paul, D., Pandey, J., & Jain, R. K. (2010). p-Nitrophenol degradation via 4-nitrocatechol in *Burkholderia* sp. SJ98 and cloning of some of the lower pathway genes. *Environmental Science & Technology*, 44(9), 3435-3441.
- Chen, Y. Y., Huang, L., Zhang, Y., Ke, C. H., & Huang, H. Q. (2014). Differential expression profile of membrane proteins in *Aplysia pleural-pedal* ganglia under the stress of methyl parathion. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(5), 3371-3385.
- Cocotl-Yanez, M., Moreno, S., Encarnación, S., López-Pliego, L., Castañeda, M., & Espín, G. (2014). A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, 160(3), 479-487.

- Díaz, C., Rodríguez, M. M., Fresneda, M., & Bisset, J. A. (2004). Determinación de la actividad glutatión-S-transferasa en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Cuba y otros países de América Latina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56(2), 111-116.
- Dubbs, J. M., & Mongkolsuk, S. (2007). Peroxiredoxins in bacterial antioxidant defense. In *Peroxiredoxin Systems* (pp. 143-193). Springer Netherlands.
- El-Naas, M. H., Mousa, H. A., & El Gamal, M. (2017). Microbial Degradation of Chlorophenols. In *Microbe-Induced Degradation of Pesticides* (pp. 23-58). Springer International Publishing.
- Encarnación, S., Hernández, M., Martínez-Batallar, G., Contreras, S., del Carmen Vargas, M., & Mora, J. (2005). Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes. *Biological Procedures Online*, 7(1), 117-135.
- Fanou, A., Weiland, F., Lück, C., Görg, A., Friess, A., & Parlar, H. (2007). A proteome analysis of *Corynebacterium glutamicum* after exposure to the herbicide 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D). *Chemosphere*, 69(1), 25-31.
- Fernández, E., & de la Paz, M. (2016). Análisis transcriptómico y proteómico de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 en respuesta a cianuro.
- Galperin, M. Y., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2014). Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D261-D269.
- Gao, M., Yu, L., Li, P., Song, X., Chen, Z., He, M., & Song, B. (2017). Label-free quantitative proteomic analysis of inhibition of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by the novel bactericide Fubianezuofeng. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 138, 37-42.
- Ghisla, S., & Thorpe, C. (2004). Acyl-CoA dehydrogenases. *European Journal of Biochemistry*, 271(3), 494-508.
- Hayer-Hartl, M., Bracher, A., & Hartl, F. U. (2016). The GroEL–GroES chaperonin machine: a nano-cage for protein folding. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(1), 62-76.

- Hoffmann, A., Bukau, B., & Kramer, G. (2010). Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(6), 650-661.
- Huang, C. Y. (2015). Inhibition of a putative dihydropyrimidinase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by flavonoids and substrates of cyclic amidohydrolases. *PLoS one*, 10(5), e0127634.
- James, P. (1997). Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 30(04), 279-331.
- Janowski, R., Kefala, G., & Weiss, M. S. (2010). The structure of dihydrodipicolinate reductase (DapB) from *Mycobacterium tuberculosis* in three crystal forms. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(1), 61-72.
- Jungblut, P. R., Holzhütter, H. G., Apweiler, R., & Schlüter, H. (2008). The speciation of the proteome. *Chemistry Central Journal*, 2(1), 16.
- Kim, Y., Kim, E. Y., Seo, Y. M., Yoon, T. K., Lee, W. S., & Lee, K. A. (2012). Function of the pentose phosphate pathway and its key enzyme, transketolase, in the regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 39(2), 58-67.
- Kramer, G., Patzelt, H., Rauch, T., Kurz, T. A., Vorderwülbecke, S., Bukau, B., & Deuerling, E. (2004). Trigger factor peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity is not essential for the folding of cytosolic proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14165-14170.
- Kuo, W. Y., & Tang, T. K. (1998). Effects of G6PD overexpression in NIH3T3 cells treated with tert-butyl hydroperoxide or paraquat. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(7-8), 1130-1138.
- Liu, S., Su, T., Zhang, C., Zhang, W. M., Zhu, D., Su, J., Wei, T., Wang, K., Huang, Y., Guo, L., Xu, S., Zhou, N. Y., & Gu, L. (2015). Crystal Structure of PnpCD, a Two-subunit Hydroquinone 1, 2-Dioxygenase, Reveals a Novel Structural Class of Fe<sup>2+</sup>-dependent Dioxygenases. *Journal of Biological Chemistry*, 290(40), 24547-24560.
- Lu, W., Li, L., Chen, M., Zhou, Z., Zhang, W., Ping, S., Yan, Y., Wang J., & Lin, M. (2013). Genome-wide transcriptional responses of *Escherichia coli* to glyphosate, a potent

- inhibitor of the shikimate pathway enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Molecular BioSystems*, 9(3), 522-530.
- Martínez-Ocampo, F. (2015). Ensamblaje del genoma de *Burkholderia* sp. y análisis de la anotación funcional de genes involucrados en la degradación de compuestos organofosforados. Tesis de Maestría en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Cuernavaca, Morelos, México.
- Martinotti, S., & Ranzato, E. (2016). 2-DE Gel Analysis: The Spot Detection. *2-D PAGE Map Analysis: Methods and Protocols*, 155-164.
- Matsumoto, K. I., Matsusaki, H., Taguchi, K., Seki, M., & Doi, Y. (2002). Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates inclusions and their associated proteins in *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, 3(4), 787-792.
- Popoca-Ursino, E. C., Martínez-Ocampo, F., Dantán-González, E., Sánchez-Salinas, E., & Ortiz-Hernández, M. L. (2017). Characterization of methyl parathion degradation by a *Burkholderia zhejiangensis* strain CEIB S4-3 isolated from agricultural soils. *Biodegradation*, 28(5-6), 351-367.
- Rhee, S. G., Kang, S. W., Chang, T. S., Jeong, W., & Kim, K. (2001). Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB life*, 52(1), 35-41.
- Schwartz, C. J., Djaman, O., Imlay, J. A., & Kiley, P. J. (2000). The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 9009-9014.
- Serre, L., de Jesus, K. P., Zelwer, C., Bureaud, N., Schoentgen, F., & Bénédicti, H. (2001). Crystalstructures of YBHB and YBCL from *Escherichia coli*, two bacterial homologues to a Raf kinase inhibitor protein 1. *Journal of Molecular Biology*, 310(3), 617-634.
- Siddavattam, D., Raju, E. R., Paul, P. E., & Merrick, M. (2006). Overexpression of parathion hydrolase in *Escherichia coli* stimulates the synthesis of outer membrane porin OmpF. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86(3), 146-150.

- Singh, O. V., & Nagaraj, N. S. (2006). Transcriptomics, proteomics and interactomics: unique approaches to track the insights of bioremediation. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 4(4), 355-362.
- Suvorova, I. A., Korostelev, Y. D., & Gelfand, M. S. (2015). GntR family of bacterial transcription factors and their DNA binding motifs: structure, positioning and co-evolution. *PLoS One*, 10(7), e0132618.
- Tedeschi, P. M., Bansal, N., Kerrigan, J. E., Abali, E. E., Scotto, K. W., & Bertino, J. R. (2016). NAD<sup>+</sup> Kinase as a Therapeutic Target in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 22(21), 5189-5195.
- Tiwari, B., Verma, E., Chakraborty, S., Srivastava, A. K., & Mishra, A. K. (2018). Tolerance strategies in cyanobacterium *Fischerella* sp. under pesticide stress and possible role of a carbohydrate-binding protein in the metabolism of methyl parathion (MP). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 127, 217-226.
- Vikram, S., Pandey, J., Bhalla, N., Pandey, G., Ghosh, A., Khan, F., Jain K. R., & Raghava, G. P. (2012). Branching of the p-nitrophenol (PNP) degradation pathway in *Burkholderia* sp. Strain SJ98: Evidences from genetic characterization of PNP gene cluster. *AMB Express*, 2(1), 1-10.
- Wang, J., Lu, Y., & Chen, Y. (2008). Comparative proteome analysis of butachlor-degrading bacteria. *Environmental Geology*, 53(6), 1339-1344.
- Wood, Z. A., Schröder, E., Harris, J. R., & Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(1), 32-40.

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS GLOBAL DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES Y DE PROTEÍNAS DE *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 DURANTE LA DEGRADACIÓN DEL PARATIÓN METÍLICO

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

Los estudios transcriptómicos y proteómicos son de gran interés para conocer el proceso de los microorganismos en la biorremediación, y como responden a cambios en el ambiente debido a la adición de contaminantes (Ahmad y Ahmad, 2014). Estos estudios se realizan en diferentes disciplinas biológicas, su uso en el campo de la biorremediación de plaguicidas también se ha reportado (Tiwari *et al.*, 2018). Se han identificado enzimas relacionadas con la degradación y la resistencia a ciertos tipos de plaguicidas (Singh y Nagaraj, 2006; Braconi *et al.*, 2008; Breugelmans *et al.*, 2010; David *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2013).

Además, se reporta que los estudios transcriptómicos proporcionan una visión más completa de los patrones de expresión de los genes que los estudios proteómicos. Por lo que, se considera que los estudios transcriptómicos son necesarios para complementar el enfoque proteómico (Singh y Nagaraj, 2006).

#### 4.2. OBJETIVO

Analizar de manera integral los resultados transcriptómicos y proteómicos, a través de la propuesta de categorías funcionales y vías metabólicas de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en presencia y ausencia del plaguicida.

## 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.3.1. Anotación funcional por COG´s

Se integraron los resultados de transcriptoma y proteoma de acuerdo a las categorías funcionales de grupos de ortólogos de genes (COG´s).

Los resultados de transcriptoma en el tiempo de cero horas, en la condición experimental con PM, muestra tres genes GED, dos de ellos agrupados en la categoría funcional [K]: transcripción y uno en la categoría [G]: transporte y metabolismo de carbohidratos, cada una representando el 12.5%, de los cuales representan el 38% de los GED, mientras que el 62% no se agrupó en ninguna categoría. No se reportaron GED para el tiempo cero horas en la condición sin PM, por lo cual no se cuenta con COG´s para esta condición. El primero demuestra que la presencia del PM provoca la expresión de factores de transcripción a diferencia de la condición en ausencia de PM donde la bacteria expresa un menor número de reguladores probablemente para el mantenimiento básico del metabolismo, y el segundo se refiere a una permeasa lo cual podría estar involucrado en el transporte del plaguicida al interior de la célula.

Por otro lado, los resultados de proteoma en el tiempo de cero horas y en la condición experimental con PM, mostraron 10 proteínas agrupadas en siete categorías funcionales. Con la finalidad de observar los COG´s más representativos, se seleccionaron los dos principales los cuales fueron la categoría [E] denominada transporte y metabolismo de aminoácidos con tres proteínas y representando el 22.2% y la categoría [F] denominada transporte y metabolismo de nucleótidos representado con dos elementos (22.2%). Por lo tanto, estos resultados demuestran la presencia de aminoácidos glucogénicos, es decir aquellos esqueletos de carbono que se degradan a piruvato,  $\alpha$ -cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato u oxalacetato, y son, por lo tanto, precursores de la glucosa. También, se encuentran aminoácidos cetogénicos, cuyos esqueletos de carbono son degradados a acetil-CoA o acetoacetato y pueden ser convertidos a ácidos grasos o cuerpos cetónicos. En la categoría [F] las proteínas están implicadas en la biosíntesis de pirimidinas y purinas en las dos condiciones experimentales; esto puede ser para la reparación

de ácidos nucleicos debido al daño que podría ocasionar el PNF, y al estrés por la falta de una fuente de carbono en la condición sin PM. Además, en la condición sin PM, se identificó una NAD (+) Cinasa, la cual cataliza la fosforilación de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD+) a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP+) utilizando ATP como donador de fosfato. El NADP+ se reduce a NADPH por deshidrogenasas, en particular glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y las enzimas málicas. El NADPH es esencial para la neutralización de los niveles peligrosamente altos de especies de oxígeno reactivo generados por el aumento de la actividad metabólica (Tedeschi *et al.*, 2016). Esta actividad puede ser debida al estrés que presenta la célula por la fuente de carbono y la necesidad de generar una fuente de carbono para su crecimiento. En la condición sin PM se encontró la categoría [M] biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana con una proteína identificada como *UDP-glucosa 4-epimerasa GalE* la cual es una enzima esencial en el metabolismo de la galactosa. Asimismo, se encontró la categoría [J] traducción, estructura ribosomal y biogénesis, identificando la proteína *30S proteína ribosomal S1* la cual es una proteína ribosómica asociada con la subunidad 30S que ha sido implicada en la traducción, la transcripción y el control de la estabilidad del ARN.

Por lo tanto, integrando los resultados tanto de transcriptoma y proteoma, en este tiempo y en las dos condiciones experimentales se observa que no se presentan los mismo COG's (Tabla 4.1), lo cual se puede inferir que los resultados de un estudio, comparado con otro, son complementarios. Por lo que, se considera que los estudios genómicos son necesarios para complementar el enfoque proteómico (Singh y Nagaraj, 2006).

**Tabla 4.1.** Categorías funcionales representativas en transcriptoma y proteoma del tiempo cero horas.

Estudio	Tiempo de muestreo y tratamiento	Principales categorías (COG's)	Definición	%
Transcriptoma	Cero horas, con PM	[K]	Transcripción	25.0
		[G]	Transporte y metabolismo de carbohidratos	12.5
	Cero horas, sin PM	--	--	-
Proteoma	Cero horas, con PM	[E]	Transporte y metabolismo de aminoácidos	22.2
		[F]	Transporte y metabolismo de nucleótidos	22.2
	Cero horas, sin PM	[M]	Biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana	33.3
		[J]	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	33.3

Para el caso del tiempo de tres horas, y en la condición experimental con PM, en el estudio del transcriptoma se encontraron 376 GED de estos tenemos a 271 GED que se agrupan en 20 COG's lo que representa el 72.3%, el 27.7% no se agrupó en ninguna categoría. Las categorías sobrerrepresentadas fueron [C]: producción y conversión de energía con 38 elementos corresponde al 14.0%, 36 elementos para la categoría [K]: transcripción (13.3%), 32 elementos para [E]: transporte y metabolismo de aminoácidos (11.8%), 23 elementos para [P]: transporte y metabolismo de iones inorgánicos (8.5%), y 22 genes con solo predicción de función general [R] representando el 8.1%. La condición experimental sin PM mostró un conjunto de 278 GED de los cuales 158 genes se agruparon en 22 COG's representando el 56.8%, y 120 elementos no se agruparon en ninguna categoría representando el 43.2%. Las cinco categorías principales, de acuerdo con el número de genes GED, fueron [P]: transporte y metabolismo de iones inorgánicos con 23 elementos (14.6%), 17 elementos de la categoría [C]: producción y conversión de energía (10.8%), 13 elementos de la [G]: transporte y metabolismo de

carbohidratos representando el 8.2%, 12 elementos de la categoría [I]: mecanismos de transducción de señales (7.6%) y 12 genes sin función asignada [S] representando el 7.6%.

En el mismo tiempo (tres horas) pero en el estudio del proteoma, y en la condición experimental con PM se obtuvieron 18 proteínas de las cuales solo 12 se agruparon en 9 COG´s representando el 66.7%, y el 33.3% con siete proteínas no se agruparon a ninguna categoría. Las cinco principales categorías fueron la [F]: transporte y metabolismo de nucleótido, [C]: producción y conversión de energía, [R]: solo predicción de función general, [E]: transporte y metabolismo de aminoácidos, cada una con dos proteínas y representando el 15.4% cada una y la categoría [M]: biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana representada con una proteína (7.7%). En el mismo tiempo, pero sin PM se obtuvieron 12 proteínas las cuales todas presentaron COG´s. Las cinco principales categorías fueron: [F]: transporte y metabolismo de nucleótido, representada con tres proteínas (25%), las categorías [C]: producción y conversión de energía e [I]: transporte y metabolismo de lípidos se encuentran representadas con dos proteínas (16.7%). La categoría [R]: solo predicción de función general y [M]: biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana se encuentran representadas con una proteína y 8.3% cada una.

En este tiempo y en la condición con PM se observa en los dos estudios que solo se comparten las categorías funcionales [C] de producción y conversión de energía, [E] denominada transporte y metabolismo de aminoácidos y la categoría [R] solo predicción de función general. En la condición sin PM solo se comparte la categoría [C] de producción y conversión de energía y la categoría (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2.** Categorías funcionales representativas en transcriptoma y proteoma del tiempo tres horas.

Estudio	Tiempo de muestreo y tratamiento	Principales categorías (COG's)	Definición	%
Transcriptoma	Tres horas, con PM	[C]	Producción y conversión de energía	14.0
		[K]	Transcripción	13.3
		[E]	Transporte y metabolismo de aminoácidos	11.8
		[P]	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	8.5
		[R]	Predicción de función general	8.1
	Tres horas, sin PM	[P]	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	14.6
		[C]	Producción y conversión de energía	10.8
		[G]	Transporte y metabolismo de carbohidratos	8.2
		[T]	Mecanismos de transducción de señales	7.6
		[S]	Sin función asignada	7.6
Proteoma	Tres horas, con PM	[F]	Transporte y metabolismo de nucleótidos	15.4
		[C]	Producción y conversión de energía	15.4
		[R]	Solo predicción de función general	15.4
		[E]	Transporte y metabolismo de aminoácidos	15.4
		[M]	Biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana	7.7
	Tres horas, sin PM	[F]	Transporte y metabolismo de nucleótidos	25.0
		[C]	Producción y conversión de energía	16.7
		[I]	Transporte y metabolismo de lípidos	16.7
		[R]	Solo predicción de función general	8.3
		[M]	Biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana	8.3

Por otro lado, en el estudio del transcriptoma, en la condición con PM y en el tiempo de nueve horas, se encontraron 756 GED donde 556 genes son agrupados en 23 COG representado el

73.5%, el resto corresponde al 26.5% con 200 elementos no se agruparon en ninguna categoría. Las cinco categorías principales, siguiendo los mismos criterios, fueron con 70 elementos la categoría [E]: transporte y metabolismo de aminoácidos (12.6%), 69 elementos para [C]: producción de energía y conversión (12.4%), 49 elementos para [J]: traducción, estructura ribosomal y biogénesis (8.8%), 48 elementos para [K]: transcripción representando el 8.6% y 39 elementos para [M]: biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana (7.0%). Sin embargo, en la condición sin PM, se encontraron 823 GED donde solo 427 genes se agruparon en 23 COG's representando el 51.9%, y el 48.1% con 396 elementos no se agruparon en ninguna categoría. Las cinco categorías principales, según el número de genes con perfiles transcripcionales diferenciales, se encontraron 46 genes con solo una función de predicción general [R] representando el 10.8%, 40 elementos para la categoría [K]: transcripción (9.4%), 39 elementos para [E]: transporte y metabolismo de aminoácidos (9.1%), 38 elementos para [T]: mecanismos de transducción de señales, representando el 8.9% y 37 genes sin función asignada [S] representando con el 8.7%.

Para el caso del proteoma, en el tiempo de nueve horas la condición experimental con PM se obtuvieron 18 proteínas, de las cuales 12 presentaron COG's representando el 66.7% y el 33.3% no se agrupó en ningún COG. En esta condición se encontró la categoría funcional [C]: producción y conversión de energía y la categoría [E]: transporte y metabolismo de aminoácidos, con dos proteínas y representada con el 16.7% cada una. Seguidas de la categoría [D] denominada control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica, [F]: transporte y metabolismo de nucleótido, [I]: transporte y metabolismo de lípidos, estas categorías fueron representadas con una proteína y con el 8.3% cada una.

Sin embargo, en la condición sin PM y en el mismo tiempo se obtuvieron ocho proteínas las cuales todas presentaron COG's y se encuentran representadas en siete categorías funcionales, las que destacan [C] de producción y conversión de energía, [F] denominada transporte y metabolismo de nucleótido, [I]: transporte y metabolismo de lípidos, [M]: biogénesis de la

envoltura, pared celular y membrana, representadas con una proteína y con el 12.5% cada una y el COG [V]: mecanismos de defensa (25.0%).

En el tiempo de nueve horas se observa en los dos estudios que se comparten categorías funcionales, en la condición con PM y sin PM se comparten las categorías [C] de producción y conversión de energía y [E] denominada transporte y metabolismo de aminoácidos (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3.** Categorías funcionales representativas en transcriptoma y proteoma del tiempo nueve horas.

Estudio	Tiempo de muestreo y tratamiento	Principales categorías (COG's)	Definición	%
Transcriptoma	Nueve horas, con PM	[E]	Transporte y metabolismo de aminoácidos	12.6
		[C]	Producción de energía y conversión	12.4
		[J]	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	8.8
		[K]	Transcripción	8.6
		[M]	Biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana	7.0
	Nueve horas, sin PM	[R]	Predicción general	10.8
		[K]	Transcripción	9.4
		[E]	Transporte y metabolismo de aminoácidos	9.1
		[T]	Mecanismos de transducción de señales	8.9
		[S]	Sin función asignada	8.7
Proteoma	Nueve horas, con PM	[C]	Producción y conversión de energía	16.7
		[E]	Transporte y metabolismo de aminoácidos	16.7
		[D]	Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica	8.3
		[F]	Transporte y metabolismo de nucleótidos	8.3
		[I]	Transporte y metabolismo de lípidos	8.3
	Nueve horas, sin PM	[C]	Producción y conversión de energía	12.5
		[F]	Transporte y metabolismo de nucleótidos	12.5
		[I]	Transporte y metabolismo de lípidos	12.5
		[M]	Biogénesis de la envoltura, pared celular y membrana	12.5
		[V]	Mecanismos de defensa	25.0

Por lo tanto, se concluye que la categoría funcional [C] denominada producción y conversión de energía, demuestra la falta de glucosa, y la presencia de PM permite a la bacteria la producción

de ATP a través de vías alternativas, y la categoría [G] sobre el transporte y metabolismo de carbohidratos que solo se encuentra en el estudio de transcriptoma. Se reporta que los carbohidratos tienen numerosas funciones cruciales en los procesos metabólicos, sirven como fuente de energía y como elementos estructurales de las células, pero no solo permite obtener energía, sino también la síntesis de aminoácidos para producir proteínas y que permitan contender con el estrés por la falta de una fuente de carbono y por la presencia del plaguicida, por lo cual en este trabajo se sobrerrepresentó la categoría [E] de transporte y metabolismo de aminoácidos.

#### 4.3.2. Análisis de la función de las proteínas utilizando Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway Color

Para ubicar en las vías metabólicas a cada una de las proteínas identificadas en proteoma y las expresadas diferencialmente en transcriptoma, se utilizó la utilidad *KEGG Pathway Color*. Cada una de las proteínas fue etiquetada en su respectiva vía, con los siguientes colores: rojo para aquellas que son expresadas en la condición con PM, verde para las proteínas expresadas en ausencia del plaguicida (Figura 4.1 y Figura 4.2). En la condición con PM se observa que las proteínas son inducidas por la presencia del plaguicida.

Se encontraron 102 vías en total en las dos condiciones experimentales (con PM y sin PM), de las cuales 29 son exclusivas en la condición con PM y seis son exclusivas en la condición sin PM, 67 se comparten en ambas condiciones (Figura 4.3).

Las 29 vías exclusivas en la condición con PM son las siguientes: *Metabolismo de butanoato*, *Metabolismo del ácido 2-oxocarboxílico*, *Degradación de limoneno y pineno*, *Síntesis y degradación de cuerpos cetónicos* (los cuerpos cetónicos se producen como resultado de la degradación de los ácidos grasos y se sintetizan en respuesta a bajos niveles de glucosa), *Metabolismo del ácido dibásico C5 ramificado*, *Metabolismo de glicerolípidos* (se

encuentran en membranas de las bacterias), *Metabolismo de arginina y prolina*, *Resistencia a betalactámicos*, *Resistencia al péptido antimicrobiano catiónico (CAMP)*, *Un grupo de carbono por folato*, *Degradación de geraniol*, *Degradación de caprolactam*, se sintetiza a partir del componente de benceno de la corriente de producción de BTEX, existen cepas que son capaces de degradarlos y utilizarlos como fuente de carbono y nitrógeno (Esikova *et al.*, 1990; Kulkarni y Kanekar, 1998; Hong *et al.*, 2015), *Metabolismo de fosfonato y fosfinato*, *Recombinación homóloga* (es un tipo de recombinación genética en la que las secuencias de nucleótidos se intercambian entre dos moléculas similares o idénticas de ADN, es la más utilizada por las células para reparar rupturas nocivas en ambas hebras de ADN), *Degradación de dioxinas*, son subproductos de la fabricación de plaguicidas (Moya *et al.*, 2011), *Metabolismo de la taurina y la hipotaurina*, *Metabolismo del fosfato de inositol*, *Metabolismo de riboflavina* (también conocida como vitamina B2, es fundamental para el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, es precursora de coenzimas como Flavina Adenina Dinucleótido (FAD) y Flavina Mononucleótido (FMN), además, se encuentra reportada que se necesitan derivados de la riboflavina para la degradación de compuestos químicos como los xenobióticos, así como de inhibir el estrés oxidativo (Souza *et al.*, 2005)), *ARN polimerasa*, *Metabolismo del ácido cianoamino*, *Biosíntesis de novobiocina*, *Metabolismo de tiamina*, *Biosíntesis de monobactam*, *Biosíntesis de aminoacil-ARNt*, *Biosíntesis de la unidad de azúcar policétido* (son metabolitos secundarios), *Biosíntesis de estreptomycin* (fue el primer antibiótico descubierto contra la tuberculosis, este antibiótico actúa contra bacterias Gram negativas y micobacterias), *Biosíntesis de lisina*, *Metabolismo de D-Glutamina y D-glutamato* (reportan que la glutamina puede influir varias formas de señalización celular, especialmente en la expresión de proteínas de choque térmico, y estas contribuyen con el mantenimiento de la homeostasis celular en presencia de agentes de estrés como especies de oxígeno reactivo (Cruzat *et al.*, 2009)) y *Metabolismo del ácido alfa linoléico* (es un ácido graso esencial).

Por otro lado, las vías exclusivas en la condición sin PM fueron seis las cuales son el *Metabolismo de almidón y sacarosa*, el *Metabolismo de amino azúcar y de azúcar nucleótido* (cuando un grupo hidroxilo de un azúcar es remplazado por el grupo amino, el compuesto resultante es un amino azúcar, encontrado en algunos antibióticos), de *Unión final no homóloga* (es una ruta que repara rupturas en el ADN, sin necesidad de un molde homólogo), *Degradación de xileno*, *Reparación de escisión de base* y *Reparación por escisión de nucleótidos* (son mecanismos de reparación del ADN en los que se elimina la zona que se encuentra el problema, y existen dos tipos lo cuales se encuentra en esta condición experimental).

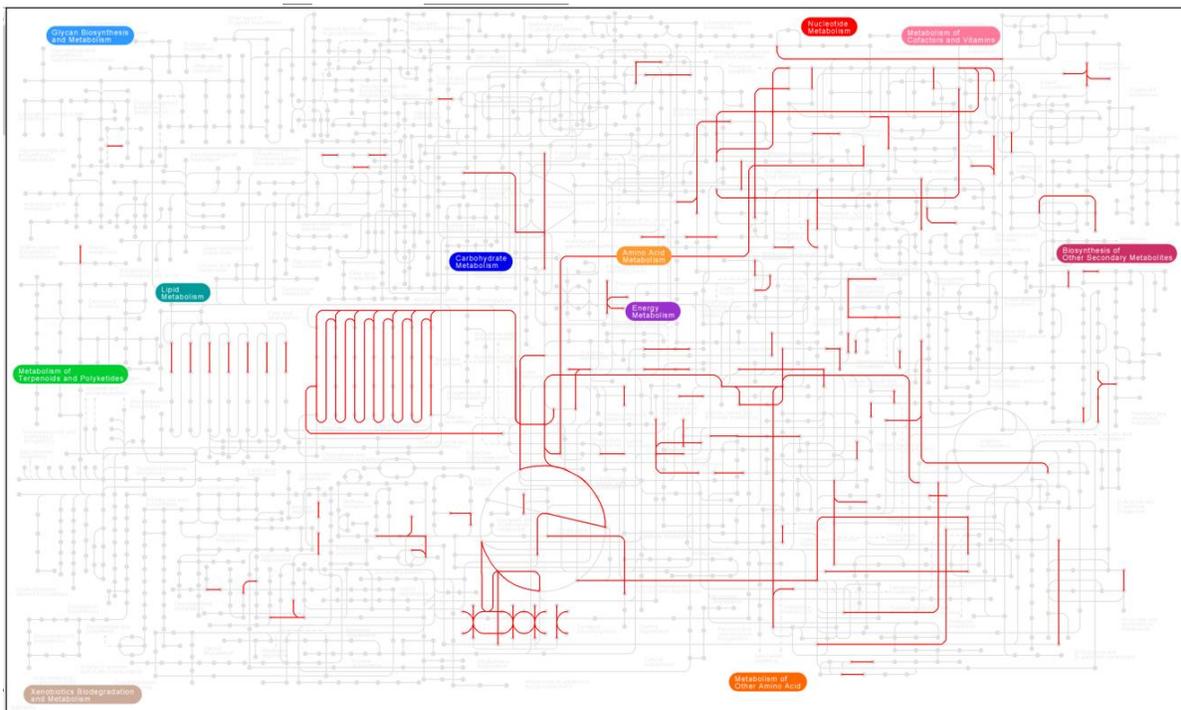
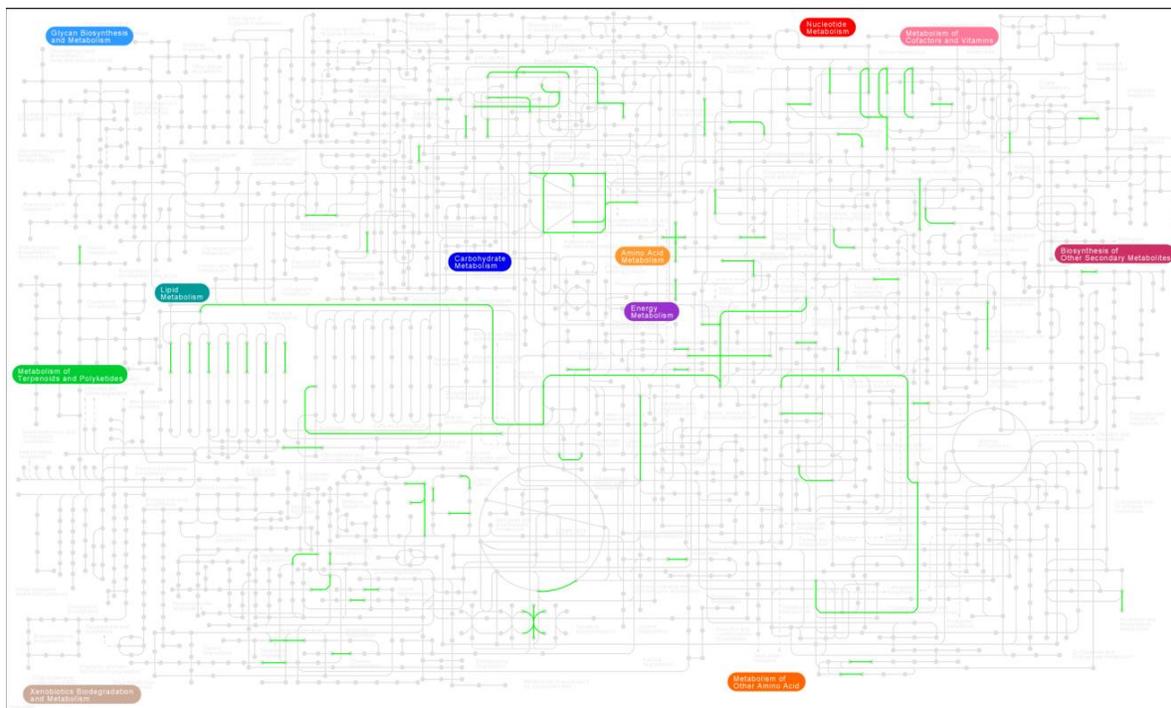
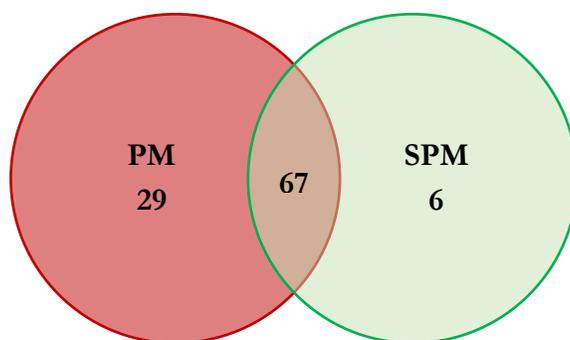


Figura 4.1. Vías metabólicas de transcriptoma y proteoma en la condición con PM.



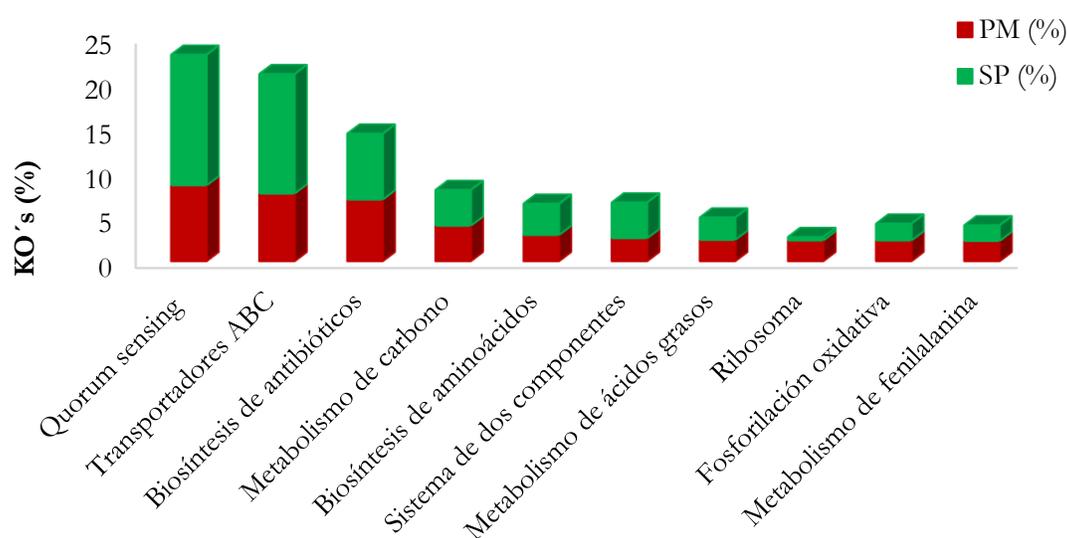
**Figura 4.2.** Vías metabólicas de transcriptoma y proteoma en la condición sin PM.



**Figura 4.3.** Diagrama de Venn de las vías metabólicas en presencia de Paratión Metílico (PM) y sin PM (SPM).

En la Figura 4.4 se presentan las 10 principales vías metabólicas en presencia y ausencia del PM, las cuales fueron Quorum sensing, Transportadores ABC, Biosíntesis de Antibióticos,

Metabolismo de carbono, Biosíntesis de aminoácidos, Metabolismo de butanoato, Sistema de dos componentes, Metabolismo de ácidos grasos, Ribosoma y Fosforilación oxidativa. En estas 10 vías se concentran alrededor del 42 y 50% de todas las proteínas sobreexpresadas en las dos condiciones, en presencia y ausencia del PM respectivamente.



### Vías metabólicas

**Figura 4.4** Distribución de proteínas de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en KEGG.

Las condiciones experimentales donde la cepa bacteriana está sometida a estrés por limitación de carbono y sometida a una fuente de carbono no convencional como lo es plaguicida, por lo que se observa que en respuesta a estas condiciones se sobre expresan diferentes vías y procesos metabólicos como el Quorum sensing (QS) el cual es un mecanismo de comunicación entre bacterias (Sibanda *et al.*, 2018) que permite controlar procesos específicos, tales como formación de biopelículas, expresión de factores de virulencia, producción de metabolitos secundarios y mecanismos de resistencia al estrés (Barreto, 2013). Se ha reportado que en diferentes microorganismos la limitación de fuente de carbono activa mecanismos de QS que promueve

que el cultivo celular inicie un estado fisiológico característico de la fase estacionaria de crecimiento (Lazazzera, 2000). El papel del quorum sensing con la presencia de plaguicidas ha sido poco estudiado.

Por otro lado, los transportadores ABC o también conocidos como transportadores dependientes de ATP son un grupo de proteínas transportadoras de membrana, que necesitan de la unión e hidrólisis del ATP para realizar su función. Participan en el transporte de azúcares, aminoácidos, iones metálicos, péptidos, proteínas y exportación de moléculas tóxicas (Davidson *et al.*, 2008; Uicab *et al.*, 2010). Por otro lado, De Waard *et al.*, 2006 menciona que los transportadores ABC están involucrados en la resistencia a toxinas y xenobióticos. En este trabajo, especialmente en el tiempo de nueve horas, los transportadores ABC mostraron una expresión en ambas condiciones (con y sin PM). Sin embargo, a pesar de que la expresión de estos transportadores es ligeramente mayor en presencia del plaguicida, el papel del PNP como inductor de estos genes no es concluyente según los datos observados.

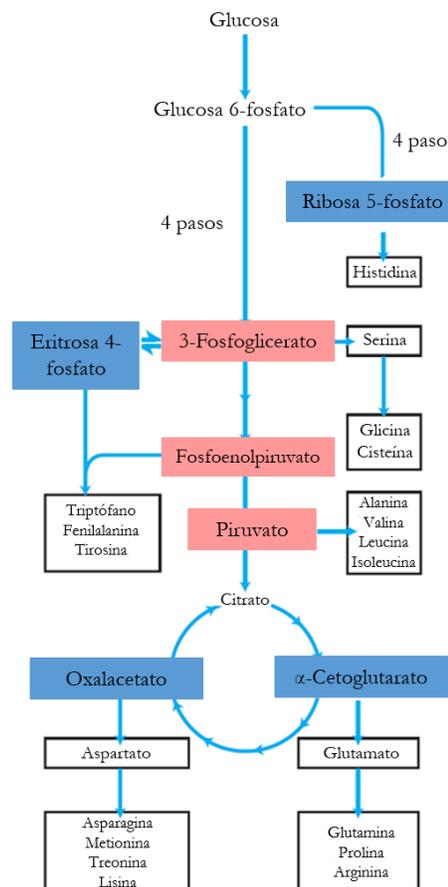
En este trabajo se observó la sobrerrepresentación también del sistema de dos componentes, que permiten regular su fisiología de acuerdo a las condiciones ambientales. Son sistemas biológicos de señalización en los que una proteína histidina quinasa, en respuesta a un estímulo, se autofosforila en un residuo de histidina para después transferir esa señal química a un residuo de aspartato en otra proteína llamada proteína reguladora de respuesta (Barba-Ostria, 2014). En el estudio de Tiwari *et al.* (2018) reportan la estrategia de tolerancia y degradación del plaguicida PM de la cianobacteria *Fischerella* sp., el cual se llevó a cabo a través de un análisis proteómico utilizando la técnica 2D acoplada con MALDI-TOF MS/MS, además de un análisis transcriptómico a través de RT-PCR. El estudio mostró algunas proteínas hipotéticas reguladas positivamente en *Fischerella* sp., en presencia del plaguicida. Se menciona que un sistema regulatorio de dos componentes transmite la señal a una proteína hipotética, de manera directa o indirecta, esta proteína posiblemente funge como factor de transcripción, por lo que se proponen que pudiera estar induciendo diferentes proteínas de respuesta al estrés, junto con la

inducción de otra proteína hipotética, una probable hidrolasa que presenta una capacidad de unión a carbohidratos y a su afinidad con el PM. Por lo tanto, sugieren que esta proteína podría tener un papel crucial en la degradación del plaguicida. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la sobreexpresión del sistema de dos componentes se observó en ambas condiciones experimentales; según estos hallazgos, en *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3, la sobreexpresión del sistema parece estar relacionada con la limitación de nutrientes y no por la presencia de PM o sus metabolitos.

La activación del metabolismo de carbono puede estar relacionado al uso de fuentes de carbono alternativas provenientes de las reservas celulares, por ejemplo, se observó el metabolismo del butanoato o también denominado butirato. El género *Burkholderia* utiliza como sustancia de reserva el polihidroxibutirato (PHB). El PHB es producido por ciertos microorganismos como un producto de asimilación de carbono (a partir de glucosa o almidón) y es empleado por los microorganismos como una forma de almacenamiento de energía para ser metabolizado cuando otras fuentes de energía comunes no están disponibles, como fue el caso de este proyecto donde la única fuente de carbono fue el plaguicida. Además, se observó el metabolismo de los ácidos grasos a través de procesos catabólicos para generar energía y esqueletos carbonados para la síntesis de otros metabolitos. También, se observó una sobreexpresión de la vía de la fosforilación oxidativa, lo que correlaciona con la oxidación de nutrientes para producir ATP. Por lo tanto, se concluye que la bacteria *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 utiliza el PNF como fuente de carbono y energía para generar metabolitos importantes para el mantenimiento de la población celular, cuando esta presente el plaguicida.

El uso de las reservas metabólicas no solo permite obtener energía para el mantenimiento celular, pero también permite obtener esqueletos carbonados para la síntesis de metabolitos necesarios como los aminoácidos. En este trabajo se observa una sobreexpresión de las rutas de biosíntesis de aminoácidos, para poder producir proteínas que les permitan contender con el estrés generándolo por la falta de una fuente de carbono y la presencia del plaguicida. Las bacterias

requieren sintetizar los aminoácidos necesarios debido a que no se suplementan en el medio de cultivo, que provienen de intermediarios de la glucólisis, del ciclo del ácido cítrico o de la vía de las pentosas fosfato (Figura 4.5). También, la sobreexpresión de ribosomas está involucrada en la producción de proteínas.



**Figura 4.5.** Aminoácidos provenientes de vías metabólicas.

Por otro lado, Popoca-Ursino *et al.* (2017) reportan que el genoma de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 contiene dos clusters de genes denominados *pnpABA'E1E2FDC* y *pnpE1E2FDC*, ubicados en los *contigs* 33 y 4, respectivamente. Estos clusters de genes codifican para enzimas con la capacidad de degradar el PNF (Hernández-Mendoza *et al.*, 2014).

Por otro lado, en este estudio, el análisis del transcriptoma reveló que estos dos clusters de genes se sobreexpresaron en presencia de PM. En la figura 4.6 se presentan los valores de veces cambio (fold change) de los genes que integran los clusters *pnpABA E1E2FDC* (Barras en color verde) y *pnpE1E2FDC* (Barras en color azul), en ambas vías de degradación del PNF, hidroquinona reportada para bacterias Gram negativas e hidroxiquinol de bacterias Gram positivas.

En el estudio de proteoma, el spot con número 4126, se identificó como una proteína hipotética de 17,737 Da (ID), se realizó un análisis BLASTp de su secuencia, arrojando como resultado una ***Hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa*** con una identidad del 75% con la de *Paraburkholderia* sp. S27 (E-value de  $6E^{-84}$  y cobertura del 98%). Esta enzima está implicada en la ruta de degradación de PNF de las Gram positivas y realiza la bioconversión de hidroxiquinol a maleilacetato. Esta proteína incrementa sus niveles de expresión en presencia de PM a partir de las tres horas (Figura 4.6). De acuerdo con las cinéticas de degradación y crecimiento (Capítulo 1), al tiempo de tres horas, momento en que ambas enzimas incrementan sus niveles de expresión, se observa la máxima concentración de PNF, por lo que la presencia de este metabolito puede estar relacionada con la inducción de estas proteínas.

Por otro lado, el spot con número 8219, también se identificó como proteína hipotética (WP\_033536888.1) con un peso molecular de 37,712 Da. Por lo que, al igual que para el spot anterior, se realizó un análisis BLASTp de la secuencia de este spot, reveló que corresponde a una ***Hidroquinona 1,2-dioxigenasa*** con una identidad del 99% con la de *Burkholderia* sp. SJ98 (E-value de 0.0, cobertura del 100%). Esta enzima cataliza la conversión de hidroquinona a 4-hidroximucónico semialdehído en la ruta de degradación de PNF en Gram negativas. En los geles de 2D se pudo observar que esta proteína incrementa su expresión a partir del tiempo 3 horas en presencia de PM, en la figura 4.6 se presenta los valores de proporción (*ratio*) observados en barras de color morado.

Los resultados obtenidos en este trabajo soportan la hipótesis de que la bacteria *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 presenta la capacidad de degradar el PNF a través de las dos vías reportadas, lo que concuerda con lo descrito por Vikram *et al.* (2012) para la bacteria *Burkholderia* sp. cepa SJ98 y Zhang *et al.* (2012) para *Pseudomonas* sp. 1-7, ambas proteobacterias presentan la capacidad de degradar al PNF a través de las dos rutas reportadas.

Es probable que la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 pueda metabolizar al PM y sus metabolitos de degradación, ácido dimetilfosfórico como fuente de fósforo y PNF como fuente de carbono y energía (Serdar *et al.*, 1982; Chakrabarty, 2017). En este trabajo se identificó que la enzima  $\beta$ -*Cetoadipil-CoA tiolasa* o también denominada 3-oxoadipil-CoA tiolasa, que incrementó sus niveles transcripcionales en presencia de PM, enzima que está involucrada en la degradación del benzoato por hidroxilación, y sintetiza la conversión de acetyl-CoA y succinil-CoA a partir del  $\beta$ -cetoadipil-CoA, metabolitos que pueden ingresar al ciclo de Krebs como se muestran en la figura 4.6.

Por otro lado, se observó que diferentes enzimas del ciclo de Krebs también incrementaron sus niveles de expresión en las condiciones con la presencia del plaguicida. El gen *gltA* correspondiente a la enzima *citrato sintasa* incremento su nivel transcripcional, esta enzima cataliza la primera reacción del ciclo metabólico, es decir, la condensación de acetyl-CoA y oxaloacetato a citrato. Dos genes de la enzima *aconitasa* también aumentaron sus niveles transcripcionales, la cual esta involucrada en la conversión de citrato a cis-aconitato y de este a isocitrato, reacciones 2 y 3 de la vía. Otra enzima de esta vía que incrementó sus niveles de transcripción fue la *Succinil-CoA sintasa*, misma que cataliza la reacción de conversión de Succinil-CoA a Succinato. Finalmente se observaron incrementos transcripcionales en las cuatro subunidades de la enzima *Succinato deshidrogenasa*, la cual convierte el succinato a fumarato (Figura 4.6)



## 4.4. CONCLUSIONES

- El plaguicida PM, después de su hidrólisis y de haber generado el PNF, puede ser canalizado al ciclo de Krebs para la generación de energía y/o la distribución del carbono de este metabolito en otras vías metabólicas.
- Los resultados del KEGG muestran que las proteínas en la condición con PM son inducidas por la presencia del plaguicida.
- Se ha reportado que en diferentes microorganismos la limitación de fuente de carbono activa mecanismos de QS que promueve que el cultivo celular inicie fase estacionaria de crecimiento, por lo que se observa en el capítulo 1 que la cepa no crece, sino más bien se mantiene en el medio de cultivo.
- De acuerdo con los resultados de transcriptoma y proteoma la bacteria *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 presenta la capacidad de degradar el PNF a través de las dos vías reportadas.
- Se identificó la enzima  $\beta$ -Cetoadipil-CoA tiolasa la cual está involucrada en la degradación del benzoato por hidroxilación, y sintetiza la conversión de acetil-CoA y succinil-CoA a partir del  $\beta$ -cetoadipil-CoA, las cuales ingresan al ciclo de Krebs.
- Se observó que diferentes enzimas del ciclo de Krebs como *Citrato sintasa*, *Aconitasa*, *Succinil-CoA sintasa* y *Succinato deshidrogenasa* también incrementaron sus niveles de expresión en las condiciones con la presencia del plaguicida.
- Tanto en la condición con PM como en la de sin plaguicida, la bacteria busca la producción de energía a través de diferentes vías metabólicas, así como de contender con el estrés por la presencia del plaguicida y por la falta de una fuente de carbono.

## 4.5. LITERATURA CONSULTADA

Ahmad, M., & Ahmad, I. (2014). Recent Advances in the Field of Bioremediation. *Biotechnology*, 11, 1-42.

- Barba-Ostria, C. A. (2014). Los sistemas de dos componentes: circuitos moleculares versátiles. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 62-76
- Barreto, A. C. (2013). Quorum Sensing: Sistemas de comunicación bacteriana. *Ciencia Actual*, 2(1), 43-50
- Braconi, D., Bernardini, G., Possenti, S., Laschi, M., Arena, S., Scaloni, A., Geminiani M., Sotgiu M., & Santucci, A. (2008). Proteomics and redox-proteomics of the effects of herbicides on a wild-type wine *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Proteome Research*, 8(1), 256-267.
- Breugelmans, P., Leroy, B., Bers, K., Dejonghe, W., Wattiez, R., De Mot, R., & Springael, D. (2010). Proteomic study of linuron and 3, 4-dichloroaniline degradation by *Variovorax* sp. WDL1: evidence for the involvement of an aniline dioxygenase-related multicomponent protein. *Research in Microbiology*, 161(3), 208-218.
- Chakrabarty, A. M. (2017). *Biodegradation and Detoxification of Environmental Pollutants: 0*. CRC Press.
- Cruzat, V. F., Petry, É. R., & Tirapegui, J. (2009). Glutamine: biochemical, metabolic, molecular aspects and supplementation. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 15(5), 392-397.
- David, J. P., Coissac, E., Melodelima, C., Poupardin, R., Riaz, M. A., Chandor-Proust, A., & Reynaud, S. (2010). Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics*, 11(1), 216.
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., & Chen, J. (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), 317-364.
- De Waard, M. A., Andrade, A. C., Hayashi, K., Schoonbeek, H. J., Stergiopoulos, I., & Zwieters, L. H. (2006). Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 62(3), 195-207.
- Esikova, T. Z., Grishchenkov, V. G., & Boronin, A. M. (1990). Plasmids controlling biodegradation of epsilon-caprolactam. *Mikrobiologiya*, 59(4), 547-552.

- Ge, L. Q., Cheng, Y., Wu, J. C., & Jahn, G. C. (2011). Proteomic analysis of insecticide triazophos-induced mating-responsive proteins of *Nilaparvata lugens* Stal (Hemiptera: Delphacidae). *Journal of Proteome Research*, 10(10), 4597-4612.
- Hong, S. J., Park, G. S., Khan, A. R., Jung, B. K., Park, Y. J., Yoo, N. K., Lee C., Park C. K. & Shin, J. H. (2015). Draft genome sequence of caprolactam-degrading *Pseudomonas putida* strain SJ3. *Genome announcements*, 3(4), e00810-15.
- Kulkarni, R. S., & Kanekar, P. P. (1998). Bioremediation of  $\epsilon$ -caprolactam from Nylon-6 waste water by use of *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-407. *Current Microbiology*, 37(3), 191-194.
- Lazazzera, B. A. (2000). Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Current Opinion in Microbiology*, 3(2), 177-182.
- Moya, M. T. F., Alonso, M. L., Lobo, J. G., & Plaza, M. J. D. (2011). Dioxinas y medio ambiente. *Revista de Salud Ambiental*, 11(1-2), 52-63.
- Seo, J. S., Keum, Y. S., & Li, Q. X. (2013). Metabolomic and proteomic insights into carbaryl catabolism by *Burkholderia* sp. C3 and degradation of ten N-methylcarbamates. *Biodegradation*, 24(6), 795-811.
- Serdar, C. M., Gibson, D. T., Munnecke, D. M., & Lancaster, J. H. (1982). Plasmid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), 246-249.
- Sibanda, S., Kwenda, S., Tanui, C. K., Shyntum, D. Y., Coutinho, T. A., & Moleleki, L. N. (2018). Transcriptome Profiling Reveals the EanI/R Quorum Sensing Regulon in *Pantoea Ananatis* LMG 2665T. *Genes*, 9(3), 148.
- Singh, O. V., & Nagaraj, N. S. (2006). Transcriptomics, proteomics and interactomics: unique approaches to track the insights of bioremediation. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 4(4), 355-362.
- Souza, A. C. S. D., Ferreira, C. V., Jucá, M. B., Aoyama, H., Cavagis, A. D. M., & Peppelenbosch, M. P. (2005). Riboflavina: uma vitamina multifuncional. *Química Nova*.

- Tang, J., Liu, L., Huang, X., Li, Y., Chen, Y., & Chen, J. (2010). Proteomic analysis of *Trichoderma atroviride* mycelia stressed by organophosphate pesticide dichlorvos. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(2), 121-127.
- Tiwari, B., Verma, E., Chakraborty, S., Srivastava, A. K., & Mishra, A. K. (2018). Tolerance strategies in cyanobacterium *Fischerella* sp. under pesticide stress and possible role of a carbohydrate-binding protein in the metabolism of methyl parathion (MP). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 127, 217-226.
- Uicab, Y. L. C., Canché, B. B. C., & Flores, I. I. (2010). Revisión de las características de los transportadores ABC involucrados en patogénesis fúngica. *Medio Ambiente y desarrollo sustentable*. 87-96.

## PERSPECTIVAS

Realizar la verificación funcional de reguladores transcripcionales como MarR, LysR, IclR, GntR, AraC y MerR y su papel en la biodegradación de PNF.

Determinar si los clusters de genes *pnp*'s presentan una organización en operon y evaluar el papel del PNF en su regulación transcripcional.

Proponer, mediante el análisis respuesta metabólica general de *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3, los mecanismos de señalización, tolerancia y asimilación metabólica del PNF.

Analizar la expresión de genes por RT-PCR de la vía de benzoato y del glioxilato y dicarboxilato, comprobando su sobreexpresión e importancia para contender con el estrés oxidativo derivado de la presencia del PNF.

En el estudio proteómico realizado en este trabajo, la enzima *mph* responsable de la hidrólisis de MP y mayoría de las enzimas responsables de la degradación de PNF no fueron identificadas, lo que contrasta con los resultados del análisis transcriptómico, por lo que un nuevo estudio con mayor sensibilidad y cobertura del perfil proteico, utilizando iTRAQ®, permitirá su indentificación.

# ANEXOS

## ANEXO 1. Spots del estadístico T0S vs T0.

SSP	T0S	Ratio	T0	Ratio
122	74	2.11	35.1	1
1114	128.8	2.59	49.7	1
1410	5.8	2.09	2.8	1
1605	20.4	2.83	7.2	1
2116	5.2	0.4	13.2	1
2124	5.5	0.57	9.8	1
2127	4.8	0.16	29.2	1
2129	20.3	8	2.5	1
2303	186	3.05	61	1
3117	7.4	180.95		1
3304	39.9	978.72		1
4718	83.3	7.68	10.9	1
5119	7.1	3.43	2.1	1
5201	90.8	4.75	19.1	1
5502	13.1	0.16	80.2	1
5507	194.3	2.19	88.9	1
5815	15.5	4.43	3.5	1
7128	26.5	648.25		1
7222	6.6	0.35	19	1
7307	5.4	0.08	68.8	1
7317	704.5	0.56	1253.5	1
8004	128.6	0.2	657.8	1
8148	3.6	87.96		1
8150		0	13.5	1
8421		0	14.4	1
8524	225.9	5.47	41.3	1

T= Tiempo, el segundo número (0, 3 y 9) corresponde a las horas de muestreo, y la letra S corresponde al tratamiento sin plaguicida.

## ANEXO 2. Spots del estadístico T3S vs T3.

SSP	T3S	Ratio	T3	Ratio
1102	272.9	1		0
1105	63.5	1		0
1108	21.3	1		0
1114	143.5	1		0
1123	8179.6	1		0
1124	16.5	1		0
1139	12.8	1		0
1140	5.2	1		0.01
1213	154.8	1		0
1217	106	1		0
1218	46.2	1		0
1305	370.3	1		0
1309	62.1	1		0
1313	85.5	1		0
1407	6	1		0.01
1408	12.8	1	5.3	0.41
1409	6.7	1		0.01
1419	58.2	1		0
1421	73.5	1		0
1506	81	1		0
1607	49	1	6	0.12
1723	305.3	1		0
2129	26.8	1	4.2	0.16
2309	25.2	1	169.5	6.73
2318	224.1	1	47.2	0.21
2320		1	15.8	421.13
2407	104.6	1	2.8	0.03
3104	23.8	1		0
3129		1	21.5	574.37
3212	20.1	1	5.3	0.26
3214	157.4	1		0
3215	1876.1	1	5360.7	2.86
3219		1	28.8	766.93
3221		1	15.6	416.26
3324		1	21.6	577.31
3512	314.1	1	35.7	0.11

T= Tiempo, el segundo número (0, 3 y 9) corresponde a las horas de muestreo, y la letra S corresponde al tratamiento sin plaguicida.

## ANEXO 2. Spots del estadístico T3S vs T3.

SSP	T3S	Ratio	T3	Ratio
4005	29.9	1	18.1	0.6
4112		1	10.7	284.45
4126		1	110.7	2951.78
4130		1	80.4	2143.83
4301	65.4	1	15.6	0.24
4303	1462.8	1	234.2	0.16
4324	77.5	1		0
4406		1	96.3	2569.89
4734	13.6	1		0
5019	28.6	1		0
5124	12.4	1		0
5126		1	35.2	938.56
5128		1	145.1	3869.18
6128	5.7	1	413.3	71.97
6131	10.6	1	20.3	1.91
6601	2732.2	1		0
7132		1	12.6	336.77
7220	13	1		0
7224	19.8	1	398.2	20.15
7319	411.6	1	651	1.58
7419	790.7	1	1387.4	1.75
7825	29.6	1	94.7	3.2
8109	50.9	1	25.4	0.5
8218	0.1	1	52.8	365.2
8219		1	10	265.64
8421		1	7.5	198.85
8536	5.6	1		0.01
8701	5.3	1	2.2	0.42

T= Tiempo, el **segundo número (0, 3 y 9)** corresponde a las horas de muestreo, y la letra **S** corresponde al tratamiento sin plaguicida.

### ANEXO 3. Spots del estadístico T9S vs T9.

SSP	T9S	Ratio	T9	Ratio
2126		1	9.6	371.64
2129	18.3	1	2	0.11
2214	5.8	1	13.7	2.35
2222		1	28.8	1119.18
2309	33.1	1	258.2	7.79
2406	5.1	1		0.01
2513	6.5	1		0
3128		1	38.8	1508.5
3130		1	15	581.17
3517	65.4	1	164.8	2.52
4219		1	12.6	489.23
4324	94.5	1	8.5	0.09
5106	31.1	1		0
5128		1	32.1	1248.48
5421		1	31.8	1236.13
6128	10.6	1	527.2	49.74
6312	9.1	1	30.2	3.33
6615	97.7	1	20.9	0.21
7101	24.3	1	34.2	1.41
7112	14.4	1	144.5	10.06
7121		1	32.7	1269.71
7132		1	30.8	1197.52
7322	12.3	1		0
7424	4.1	1	15.6	3.84
7501	62	1		0
7517	28.3	1		0
8103		1	12.7	493.86
8149	8	1		0
8150	3.2	1	11	3.48
8151	7.3	1		0
8211	10	1	3.2	0.32
8213	1.9	1	39.5	20.95
8214	1.1	1		0.03
8218	2.7	1	43.4	16.36
8219		1	27.1	1051.8
8537	6.3	1		0
8538	3.4	1		0.01
9305	5.4	1		0.01

#### ANEXO 4. Spots exclusivos del T0S.

SSP	T0S	Ratio
513	25.5	625.39
2122	8.6	210.02
3117	7.4	180.95
3304	39.9	978.72
5621	979.3	23992.8
7128	26.5	648.25
7320	11.5	282.89
8050	6	147.47
8130	3	73.01
8148	3.6	87.96
8215	2.6	64.04
8218	1.2	28.74
8501	60.6	1485.21

T= Tiempo, el **segundo número (0, 3 y 9)** corresponde a las horas de muestreo, y la letra **S** corresponde al tratamiento sin plaguicida.

## **A**NEXO 5. Spots exclusivos del T0.

<b>SSP</b>	<b>T0</b>	<b>Ratio</b>
2419	2.8	137.09
3128	94.1	4563.99
3428	28.1	1362.67
6421	29.2	1414.46
8150	13.5	657.36
8421	14.4	699.1

T= Tiempo y el segundo número (0, 3 y 9) corresponde a las horas de muestreo.

## ANEXO 6. Spots exclusivos del T3S.

SSP	T3S	Ratio
1101	162.1	3465.27
1102	272.9	5835.99
1105	63.5	1357.49
1108	21.3	455.38
1114	143.5	3069.2
1123	8179.6	174909.16
1124	16.5	352.53
1134	124.4	2660.16
1139	12.8	273.06
1140	5.2	112.16
1203	505.9	10818.86
1206	22.3	477.55
1207	143.5	3068.88
1209	114.4	2446.26
1210	62.8	1342.78
1213	154.8	3310.42
1216	150.6	3220.88
1217	106	2266.01
1218	46.2	988.49
1224	11.8	252.44
1305	370.3	7917.75
1309	62.1	1327.49
1313	85.5	1828.31
1407	6	127.63
1409	6.7	142.35
1419	58.2	1243.62
1421	73.5	1571.66
1503	54.2	1158.86
1505	542.9	11609.91
1506	81	1732.5
1507	178.1	3808.08
1611	132.1	2825.53
1723	305.3	6528.26
2133	6.5	138.94
2216	67.7	1447.99
2314	80.9	1730.22

T= Tiempo, el segundo número (0, 3 y 9) corresponde a las horas de muestreo, y la letra S corresponde al tratamiento sin plaguicida.

**ANEXO 6.** Spots exclusivos del T3S.

<b>SSP</b>	<b>T3S</b>	<b>Ratio</b>
2408	37.6	803.59
2501	23.8	508.76
2507	40	855.83
3104	23.8	508.84
3209	50.6	1082.94
3214	157.4	3365.97
3309	116	2481.28
3317	35.1	750.95
3417	51.3	1097.28
4324	77.5	1656.79
4405	36.5	779.97
4734	13.6	290.98
5019	28.6	611.27
5124	12.4	264.45
6601	2732.2	58423.76
7220	13	277.13
8536	5.6	120.65

T= Tiempo, el **segundo número (0, 3 y 9)** corresponde a las horas de muestreo, y la letra **S** corresponde al tratamiento sin plaguicida.

## ANEXO 7. Spots exclusivos del T3.

SSP	T3	Ratio
2320	15.8	421.13
2414	20.8	555.71
3127	16.6	441.84
3129	21.5	574.37
3219	28.8	766.93
3221	15.6	416.26
3322	105.8	2822.22
3324	21.6	577.31
3431	18.7	499.97
3528	42.2	1124.34
4112	10.7	284.45
4130	80.4	2143.83
4406	96.3	2569.89
5126	35.2	938.56
5128	145.1	3869.18
6416	17.4	463.25
6418	52.4	1397.35

T= Tiempo y el segundo número (0, 3 y 9) corresponde a las horas de muestreo.

**ANEXO 8.** Spots exclusivos del T9S.

<b>SSP</b>	<b>T9S</b>	<b>Ratio</b>
1303	97.6	3111.87
2406	5.1	161.27
2418	35.1	1120.15
2513	6.5	208.51
3311	138.1	4403.6
3412	36.8	1172.84
3529	35.4	1127.77
3619	42.9	1369.82
5106	31.1	991.17
5519	88.6	2827.55
5521	102	3253.95
6419	50.4	1608.49
6518	7.6	241.87
7322	12.3	390.83
7501	62	1978.89
7517	28.3	901.2
8134	3.6	114.6
8149	8	255.29
8151	7.3	232.17
8214	1.1	33.98
8537	6.3	202.34
8538	3.4	107.22
9305	5.4	171.41

T= Tiempo y el segundo número (0, 3 y 9) corresponde a las horas de muestreo.

**ANEXO 9.** Spots exclusivos del T9.

<b>SSP</b>	<b>T9</b>	<b>Ratio</b>
2126	9.6	371.64
2222	28.8	1119.18
3130	15	581.17
4126	277.2	10774.29
4219	12.6	489.23
5421	31.8	1236.13
6514	97.6	3792.96
7121	32.7	1269.71
7132	30.8	1197.52
8103	12.7	493.86
8219	27.1	1051.8

T= Tiempo y el segundo número (0, 3 y 9) corresponde a las horas de muestreo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández (Tutor)  
Dr. Efraín Tovar Sánchez  
Dr. Jorge Luis Folch Mallol  
Dr. Armando Hernández Mendoza  
Dr. Sergio Encarnación Guevara  
Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "Análisis del transcriptoma y proteoma de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en el proceso de biodegradación del plaguicida paratión metílico"

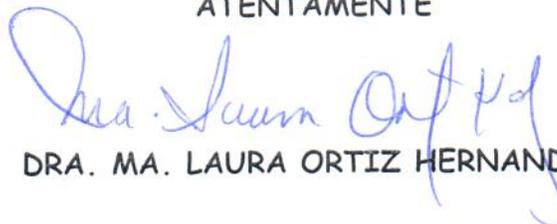
Alumno que la presenta a revisión: MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DRA. MA. LAURA ORTIZ HERNANDEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández (Tutor)  
Dr. Efraín Tovar Sánchez  
Dr. Jorge Luis Folch Mallol  
Dr. Armando Hernández Mendoza  
Dr. Sergio Encarnación Guevara  
Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "Análisis del transcriptoma y proteoma de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en el proceso de biodegradación del plaguicida paratión metílico"

Alumno que la presenta a revisión: MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. EFRAIN TOVAR SANCHEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández (Tutor)  
Dr. Efraín Tovar Sánchez  
Dr. Jorge Luis Folch Mallol  
Dr. Armando Hernández Mendoza  
Dr. Sergio Encarnación Guevara  
Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "Análisis del transcriptoma y proteoma de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en el proceso de biodegradación del plaguicida paratión metílico"

Alumno que la presenta a revisión: MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández (Tutor)  
Dr. Efraín Tovar Sánchez  
Dr. Jorge Luis Folch Mallol  
Dr. Armando Hernández Mendoza  
Dr. Sergio Encarnación Guevara  
Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "Análisis del transcriptoma y proteoma de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en el proceso de biodegradación del plaguicida paratión metílico"

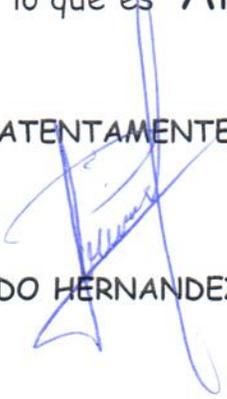
Alumno que la presenta a revisión: MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DR. ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández (Tutor)  
Dr. Efraín Tovar Sánchez  
Dr. Jorge Luis Folch Mallol  
Dr. Armando Hernández Mendoza  
Dr. Sergio Encarnación Guevara  
Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "Análisis del transcriptoma y proteoma de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en el proceso de biodegradación del plaguicida paratión metílico"

Alumno que la presenta a revisión: MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. SERGIO ENCARNACION GUEVARA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández (Tutor)  
Dr. Efraín Tovar Sánchez  
Dr. Jorge Luis Folch Mallol  
Dr. Armando Hernández Mendoza  
Dr. Sergio Encarnación Guevara  
Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "Análisis del transcriptoma y proteoma de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en el proceso de biodegradación del plaguicida paratión metílico"

Alumno que la presenta a revisión: MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. LUCIA PEREZGASGA CISCOMANI



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández (Tutor)  
Dr. Efraín Tovar Sánchez  
Dr. Jorge Luis Folch Mallol  
Dr. Armando Hernández Mendoza  
Dr. Sergio Encarnación Guevara  
Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "Análisis del transcriptoma y proteoma de la cepa *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 en el proceso de biodegradación del plaguicida paratión metílico"

Alumno que la presenta a revisión: MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA