



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA UAEM

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE LA
CEPA *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 EN
EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE
PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A:

Bióloga Yitzel Gama Martínez

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. LAURA ORTIZ
HERNÁNDEZ**

CO-DIRECTOR DE TESIS: EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ

CUERNAVACA, MOR., MÉXICO

MARZO DEL 2019

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Plaguicidas	4
2.2 Organofosforados	6
2.2.1 Características químicas y mecanismo de acción de los OFs	6
2.3 Paratión Metílico	9
2.4 Biodegradación del PM y PNF	10
2.5 Transcriptoma	14
3. ANTECEDENTES DIRECTOS.	19
4. JUSTIFICACIÓN	24
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS	25
6.1. Objetivo general	25
6.2. Objetivos particulares	25
7 METODOLOGÍA	26
7.1. Condiciones de cultivo	26
7.2 Toma de muestra	26
7.3. Extracción de RNA	27
7.4. Análisis y mapeo de los datos del RNA-seq	27
7.5 Clasificación funcional	28
7.5.1 Clasificación por COG (Grupos de genes ortólogos)	28
7.5.2 Clasificación por KEGG (Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas) para la asignación de vías metabólicas	29
7.6 PCR cuantitativo (qRT-PCR)	29

8. RESULTADOS	30
8.1 Cinética de crecimiento de <i>B. cenocepacia</i> CEIB S5-2 y degradación del PNF	30
8.2 Extracción de RNA	32
8.3 Análisis e integridad del RNA total	37
8.4. Expresión diferencial de genes	40
8.5 Clasificación funcional	42
8.5.1 Categorización funcional de acuerdo al COG y análisis de la anotación funcional	42
8.4.2 Anotación funcional por Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	46
8.6 Propuesta del mecanismo de degradación del PM y PNF	50
8.6.1 Reconocimiento, hidrólisis del PM y genes tempranos en la degradación del PNF	50
8.6.2 Degradación del PNF	55
8.6.3 Perfil transcripcional de <i>B. cenocepacia</i> CEIB S5-2 posterior a la hidrólisis de PM y mineralización del PNF	64
8.7. Validación de los datos por medio de RT-PCR	69
9. CONCLUSIONES	73
10. PERSPECTIVAS	75
11. REFERENCIAS	76
12. ANEXOS	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química general de los compuestos organofosforados	7
Figura 2. Estructura química del paratión metílico.....	10
Figura 3. Hidrolisis del Paratión Metílico.....	11
Figura 4. Diagrama que representa las dos rutas de degradación del p-Nitrofenol.	12
Figura 5. Genes involucrados en la deradación de PNF de <i>Burkholderia</i> sp. cepa SJ98.....	14
Figura 6. (A)Hidrolisis del MP, y (B) producción y degradación del PNP por la cepa S5-2.....	19
Figura 7. Concentración y degradación del PNP a lo largo de 6 horas incubación en presencia de la cepa S5-2.....	22
Figura 8. Definición del operón <u>pnpABA'E1E2FDC</u>	23
Figura 9. Cinética de crecimiento y degradación del PM y el PNF.....	31
Figura 10. Gel representativo del RNA total correspondiente a <i>B. cenocepacia</i> CEIB S5-2 en presencia (PM) y ausencia (SP) de paratión metílico.	32
Figura 11. RNA total tratado con DNAsa.....	34
Figura 12. Electroforesis de los productos de PCR.	34
Figura 13. Expresión de los genes <i>pnpA</i> y <i>pnpE1</i> en ausencia (SP) y en presencia de (PM) de paratión metílico.....	35
Figura 14. RT-PCR punto final. Amplificación de algunos genes involucrados en la degradación del PNP.	37
Figura 15. Imagen representativa de los 18 RNA analizadas por “RNA ScreenTape” de Agilent.	38
Figura 16. Electroferogramas representativos de dos de las 18 muestras de RNA.	39
Figura 17. Diagrama de Ven que muestra la distribución de los genes expresados diferencialmente.	41

Figura 18. Distribución de los COG's en <i>B. cenocepacia</i> CEIB S5-2.....	44
Figura 19. Distribución de los DEG's de <i>B. cenocepacia</i> CEIB S5-2 en los mapas de KEGG a las dos horas de incubación.....	47
Figura 20. Distribución de los DEG's de <i>B. cenocepacia</i> CEIB S5-2 en los mapas de KEGG a las cinco horas de incubación.	48
Figura 21. Expresión diferencial de los diez genes que codifican para β-lactamasas	52
Figura 22. Vía del β-ketoaciloadipato y sus modificaciones.....	59
Figura 23. Ubicación de los genes pnp's en la vía de degradación del PNP.....	63
Figura 24. Expresión relativa de los genes implicados en la hidrólisis del PM y principio de degradación del PNF en el tiempo inicial	71
Figura 25. Expresión relativa de los genes implicados en la hidrólisis del PM y degradación del PNF en el tiempo dos horas.	71
Figura 26. Expresión relativa de los genes implicados en la hidrólisis del PM y degradación del PNF en el tiempo cinco horas.	72
Figura 27. Expresión relativa del gen Ga0125972_1044180 (GAF) durante la exposición a PM y PNF en los tiempos cero, dos y cinco horas	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su composición química.	5
Tabla 2. Clasificación de los compuestos organofosforados de acuerdo a sus características químicas	8
Tabla 3. Características generales del perfil transcripcional de <i>B. cenocepacia</i> CEIB S5-2 en presencia y ausencia de PM.	41
Tabla 4. COG's principales de <i>B. cenocepacia</i> CEIB S5-2 a las 0, 2 y 5 horas	45

ANEXOS

Figura A 1. Anotación preliminar de los genes involucrados en la degradación del PNP.....	88
Figura A 2. Concentración e integridad del RNA total de <i>B. cenocepacia</i> (Bc).	89
Figura A 3. Concentración e integridad del RNA total de las 18 muestras posterior al tratamiento con DNAsa, de <i>B. cenocepacia</i> (Bc).	90
Figura A 4. Concentración e integridad de los 18 RNA's proporcionada por la empresa GENEWIX.	91
Figura A 5. Representacion esquemática del probable mecanismo de tolerancia y degradación de MP por <i>Fischerella sp.</i>	92
Figura A 6. Agrupamiento de las réplicas por tiempo..	93
Figura A 7. Análisis de componentes principales del perfil transcripcional en presencia y en ausencia de PM por tiempo.	94
Figura A 8. Expresión diferencial de los genes de <i>B. cenocepacia</i> CEIB S5-2 entre ambas condiciones y la significancia de los mismos.....	95

1. INTRODUCCIÓN

La explotación indiscriminada de recursos naturales y la síntesis de compuestos xenobióticos a gran escala han provocado problemas ambientales tales como la contaminación del aire, el agua y de ecosistemas terrestres, efectos nocivos sobre una amplia variedad de ecosistemas, y disrupciones en los ciclos biogeoquímicos (Singh y Wallker, 2006). Entre estos compuestos xenobióticos se encuentran los plaguicidas, sustancias que son ampliamente usadas para el control de plagas. De manera general, el término plaguicida se refiere a sustancias químicas que son biológicamente activas que interfiere en procesos biológicos de organismos blanco, ya sean insectos, mohos u hongos, entre otros. Los plaguicidas han sido ampliamente usados en la mayoría de las áreas de producción agrícola con el fin de minimizar el grado de infestación por la plaga y así proteger los cultivos de pérdidas potenciales del rendimiento y calidad del producto.

En la actualidad, los plaguicidas mayormente utilizados son los pertenecientes al grupo de los organofosforados (OF) para control de plagas agrícolas y domésticas. En el año 2004 la EPA (US Environmental Protection Agency) reportó que sólo en Estados Unidos de América se aplican alrededor de 40 millones de kilos anualmente. Sin embargo, se estima que aproximadamente el 90% de las aplicaciones de plaguicidas para uso agrícola nunca logran llegar a sus organismos blanco sino que, en su lugar, se dispersan por el aire, el suelo y el agua (Singh y Wallker, 2006; Kanekar *et al.*, 2004; Munnecke, 1980). Como consecuencia, estos compuestos son frecuentemente detectados en lugares inesperados, además de que sus residuos y metabolitos se encuentran acumulados en altas concentraciones en los suelos. Adicionalmente, ya que estos plaguicidas OF inhiben de manera irreversible la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), la cual está presente en todos los vertebrados y está involucrada en la hidrólisis de la acetilcolina (ACh), el potencial de daño a organismos no blanco, incluyendo al humano, causado por estos compuestos es extremadamente alto. Las afecciones a la salud humana y de otros organismo, causado por este tipo de compuesto es un problema a nivel mundial con una tasa de alrededor de 3 millones de intoxicaciones y alrededor de 200,000 muertes anuales reportadas para el año

2004 (Damalas, 2009; Shen *et al.*, 2010; Sogorb *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de que el uso de los OF ha sido prohibido en varios países debido a su toxicidad algunos de estos, especialmente el paration y el paration metílico (*O,O-dimethyl-O-p-nitro-phenyl- phosphorothioate*, PM), siguen siendo ampliamente utilizados para el control de plagas.

Debido a su alta toxicidad hacia mamíferos y las preocupaciones ambientales asociadas con la acumulación de estos plaguicidas en suministros de agua y comida, como ya se había mencionado, es menester el desarrollo de estrategias confiables y económicas para la detoxificación de desechos organofosforados. La degradación de estos compuestos mediada por microorganismos ha recibido especial atención y diversas bacterias capaces de degradar paratión y paratión metílico (PM) han sido aisladas de suelos agrícolas, en diversas áreas geográficas (Siddavattam *et al.*, 2003; Pakala *et al.*, 2006). La mayoría de las bacterias capaces de degradar el PM poseen una enzima triesterasa comúnmente denominada paratión hidrolasa, involucrada en la hidrólisis del enlace triéster, proceso por el cual se produce el *p*- Nitrofenol (PNF) y ácido dimetiltiofosfórico, los cuales no son capaces de inhibir a la (AChE) y, por lo tanto, son menos tóxicos para los organismos con sistemas nerviosos más desarrollados. Sin embargo, el PNF demuestra una mayor toxicidad hacia la microflora del suelo, motivo por el cual la EPA lo considera un contaminante ambiental (Chaudhry *et al.*, 1988; Errampalli *et al.*, 1999; Munnecke y Hsieh, 1976; Rani y Lalithakumari, 1994).

Mientras que se han logrado aislar bacterias capaces de degradar al PM y al PNF, los reportes de bacterias capaces de degradar simultáneamente ambos compuestos son muy escasos. A la fecha se han reportado alrededor de 20 bacterias capaces de degradar el PNF bajo condiciones aeróbicas, adicionalmente se han descrito dos rutas de degradación independientes: la vía de la hidroquinona (HQ) preferentemente en bacterias Gram-negativas, involucra la conversión del PNF a Hidroquinona y la vía del hidroxiquinol (BT) comúnmente reportada en bacterias Gram positivas. Por otro lado, también se han reportado variaciones en esta generalización demostrando la participación de ambas vías en la degradación del PNF. (Vikram *et al.*, 2012).

En el 2012, Popoca Ursino en el laboratorio de Investigaciones Ambientales aisló tres cepas de suelos agrícolas de Tepoztlán, Morelos, México, identificadas como *Burkholderia cenocepacia* cepa CEIB S5-2, *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-1 y *Caballeronia zhejiangensis* CEIB S4-3, anteriormente denominada *Burkholderia zhejiangensis* cepa CEIB S4-3, las cuales demostraron ser capaces de hidrolizar el PM y de degradar por completo el PNF de manera simultánea (Hernández-Mendoza *et al.*, 2014; Martínez-Ocampo *et al.*, 2015). Más recientemente, Quintero y colaboradores (2015) investigaron el proteoma de la cepa *Burkholderia cenocepacia* cepa CEIB S5-2, análisis por el cual demostraron una expresión diferencial significativa de algunas proteínas en dos diferentes condiciones, en presencia de PM y en ausencia de PM, e inclusive entre diferentes tiempos de muestro lo que sugiera cambios en el perfil transcripcional de la cepa *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2.

En este trabajo se pretende vislumbrar los cambios en la expresión transcripcional de *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 en presencia de PM, basándonos en el análisis del transcriptoma por medio de RNA-seq, con la finalidad de discernir, de manera más profunda, la respuesta de *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 hacia el PM, observando los circuitos de regulación que sufre durante la hidrolisis del PM y la degradación de sus productos, como el PNF.

2. ANTECEDENTES

2.1 Plaguicidas

El término plaguicida se refiere a cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinado a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga (EPA, 2004). Los plaguicidas son utilizados extensamente en la mayoría de las áreas de producción agrícola para minimizar la infestación por plagas y, de esa manera, proteger los cultivos de pérdidas potenciales. De hecho el uso de plaguicidas se remonta mil años atrás, cuando los sumerios y romanos controlaban las plagas usando varios compuestos químicos como el mercurio, arsénico, sulfuro, cobre o extractos de plantas. Posteriormente, después de la Segunda Guerra Mundial, con la introducción del DDT (diclorodifeniltricloroetano), BHC (benzene hexachloride), aldrin, dieldrin, endrin y 2,4-D (2,4-ácido diclorofenoxiacético) el uso de los plaguicidas se popularizó debido a su aparente efectividad, sus bajos costos y su fácil manejo. Sin embargo, su uso indiscriminado en programas de salud pública y agrícola ha causado severos daños ambientales y riesgos para la salud, incluyendo casos intoxicación humana aguda y crónica (Ellenhorn *et al.*, 1997; Pajoumand *et al.*, 2002; Mohammad *et al.*, 2004).

Los plaguicidas incluyen insecticidas (organofosfatos, carbamatos, organoclorados, etc), rodenticida (anticoagulante), herbicidas (captan, ditiocarbamatos), y fumigantes (ethylene dibromide, methyl bromide) y debido a sus características químicas son compuestos persistentes que resisten, en grado variable, la degradación fotoquímica, química o bioquímica, por lo que su vida media en el medio ambiente puede ser elevada, dependiendo de su estructura química. Estos compuestos se han clasificado basándose en criterios como: su toxicidad, su modo de acción y la familia química a la que pertenecen (Badii y Varela, 2008) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su composición química (modificado de Ortiz-Hernández, 2002).

Grupo	Composición
Organoclorados	Átomos de carbono, cloro, hidrógeno y en ocasiones oxígeno. Carecen de sitios intramoleculares activos. Son apolares y lipofílicos, muy estables en el ambiente.
Organofosforados	Derivados del ácido fosfórico. Poseen un átomo central de fósforo en la molécula. Mas tóxicos y menos estables en relación a los organoclorados.
Carbamatos	Estructura química basada en un átomo alcaloide de la planta <i>Physistigma venenosum</i> .
Tiocarbamatos	Difieren de los carbamatos en su estructura molecular en que contienen un grupo -S- en su composición.
Piretroides	Compuestos sintéticos similares a las piretrinas (alcaloides obtenidos de los pétalos de <i>Chysanthemum cinerariefolium</i>).
Organoazufrados	Poseen un azufre como átomo central en su molécula. Tóxicos a ácaros y de baja toxicidad a insectos.
Dinitrofenoles	Se reconocen por la presencia de dos grupos nitro (-NO ₂) unidos a un anillo fenólico
Compuestos inorgánicos	Carecen de carbono en su composición.
Compuestos de origen botánico	Productos derivados directamente de vegetales que no se sintetizan químicamente.
Biológicos	Virus, microorganismos derivados de su metabolismo.
Organoestánicos	Presencia de un estaño como átomo central de la molécula.
De composición diversa	De cobre, derivados de triazinas, de la urea, de cloronitrofenólicos, del ácido fenoxiacético, bupiridilos, ácidos tricloroacéticos, etc.

2.2 Organofosforados

Entre los compuestos enlistados anteriormente, los organofosforados (OF) son los mayormente utilizados alrededor del mundo como insecticidas, nematocidas o con fines bélicos. El primer insecticida organofosforado, tetraetil pirofosfato, fue creado en 1937. Posteriormente, más compuestos OFs fueron comercializados. Actualmente se reporta que estos compuestos representan aproximadamente el 38% del total de los plaguicidas utilizados en todo el mundo (Post, 1998; Dragun, 1984). En el 2004 la EPA reportó que cerca de 40 millones de kilos de organofosforados son aplicados anualmente, solamente en Estados Unidos.

El uso continuo y excesivo de estos compuestos ha provocado la contaminación de varios ecosistemas de diferentes partes del mundo, debido a que sus compuestos tóxicos y los productos de su hidrólisis permanecen en el suelo, en la superficie del agua así como en los sedimentos marinos y en el aire, aún después de un tiempo de haber sido aplicados (KaviKarunya y Reetha, 2012). Adicionalmente varios compuestos organofosforados son utilizados en los animales y, debido a que son liposolubles, penetran la piel del animal permaneciendo en la carne y leche (MAFF/HSE, 1995). En el año 2004, Sogorb y colaboradores reportaron alrededor de 3 millones de intoxicaciones, provocados por estos compuestos, y 200,000 muertes anualmente. Estos compuestos han estado implicados en varias enfermedades del sistema nervioso y muscular en humanos.

2.2.1 Características químicas y mecanismo de acción de los OFs

Químicamente estos compuestos organofosforados son ésteres, amidas o tioles derivados de los ácidos fosfórico, fosfónico, fosforotioico o fosforoditioico (Cope *et al.*, 2004) y generalmente son los plaguicidas más tóxicos para los vertebrados. Sus propiedades insecticidas fueron descubiertas hasta 1937 por el Dr. Schader quién desarrolló su fórmula básica (Figura 1.). En la cual R_1 y R_2 son comúnmente grupos alquilo o arilo, uno de los sustituyentes (X) puede ser diverso y puede pertenecer a grupos alifáticos, aromáticos o heterocíclicos. El grupo X se

denomina grupo saliente debido a que en la hidrolisis del enlace ester se libera del fosforo (Tang *et al.*, 2006; Sogorb y Vilanova, 2002).

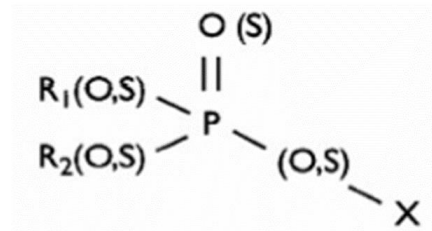


Figura 1. Estructura química general de los compuestos organofosforados (Vilanova, 2002)

Los compuestos OFs presentan dos características distintivas, una es que generalmente son más tóxicos para los vertebrados que los organoclorados, y dos, son químicamente más inestables que estos últimos. Es esta última característica la que los llevó a la agricultura como substitutos de los organoclorados, en particular del DDT.

Los OF's ejercen su acción a través de la inhibición de colinesterasas (ChE). En la sinapsis un impulso es transmitido por la acetilcolina (Ach) (Toole & Toole, 1995), la cual es destruida por la enzima colinesterasa, provocando que la transmisión de impulsos cese evitando que el sistema nervioso se sobreestime o se abruma. La acetilcolinesterasa reconoce a su sustrato, la acetil colina y la convierte en colina y acetil CoA. En reacciones posteriores se libera la colina del complejo enzima-sustrato y la acetilcolinesterasa vuelve a ser activa. Estas reacciones pasan en órdenes de milisegundos y continúan constantemente, tanto como sea necesario, bajo condiciones normales. Los OFs inhiben la actividad de la ChE uniéndose al enzima de manera covalente, de este modo cambian su estructura, lo que evita que interactúe con su sustrato alterando su función. Los compuestos OFs se unen específicamente al residuo serina 203 del sitio activo, por otra parte, el grupo saliente se une al hidrogeno del residuo histidina 447 liberándose del fosfato, dejando al enzima fosforilado, inhibiendo al enzima por un periodo de horas o días, provocando la acumulación de acetilcolina. Los nervios entonces son sobreestimados lo que

provoca convulsiones, parálisis y finalmente la muerte (Ragnarsdottir, 2000; Manahan, 1992; Ware y Whitacre, 2004).

Los compuestos OFs están divididos en tres grandes grupos, derivados de alifáticos, heterocíclicos y fenilos (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de los compuestos organofosforados de acuerdo a sus características químicas (Ware y Whitacre, 2004)

Grupo	Características	Ejemplos
Derivados alifáticos	El termino alifático literalmente significa “cadena de carbonos”. Todos los compuestos OFs alifáticos son derivados de ácidos fosfóricos unidos a una cadena corta de carbonos	TEPP (tetreatil pirofosfato) Malatión (O,O- dimethyl-S-1,2-di(carboethoxy) ethyl phosphorodithioate) Triclorfon (dimethyl (2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonato), entre otros.
Derivados fenilo	Los compuestos OFs fenilos contienen un anillo de benceno, donde uno de sus hidrógenos es desplazado por la unión al fosforo y otros son frecuentemente desplazados por Cl, NO ₂ , CH ₃ , CN o S.	Paration Etilico (O,O-diethyl O-p-nitrophenyl phosphorotioato) Paratión metílico (O,O-dimetyl O-p nitrophenyl phosphorotioato), entre otros
Derivados heterocíclicos	Las estructuras cíclicas están compuestas por átomos diferentes	Diazinon (O,O-diethyl O-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) phosphorothioato Azinphos-methyl (O,O-dimethyl S (4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3(4H)-ylmethyl) phosphorothioato)

Los OFs fenilo son en general más estables que los OFs alifáticos; sus residuos duran un poco más que los alifáticos. El paratión etílico es el más conocido de los OFs derivados del fenilo y fue el segundo insecticida utilizado en la agricultura. Sin embargo debido a su toxicidad, la EPA prohibió la mayoría de sus aplicaciones en el año 1991. Posteriormente el paratión metílico fue

introducido en 1949, este compuesto es considerado moderadamente persistente con una vida media de 25-130 días en el suelo y presenta una DL50 de 3-30 mg/Kg en mamíferos.

2.3 Paratión Metílico

El paratión metílico (PM) (Figura 2) se ha utilizado para el control de diferentes tipos de plagas, incluyendo ácaros, gorgojos, pulgones y saltamontes en cultivos de alfalfa, almendras, cebada, frijol, repollo, maíz, cebolla, arroz, entre otros. El PM fue registrado, por primera vez, para uso en 1986 y en agosto de 1999 un acuerdo fue firmado por la EPA y por agricultores, voluntariamente, para cancelar su uso en diferentes cultivos y abordar estudios para redefinir riesgos ocupacionales y de ingesta.

Según la EPA el PM es altamente tóxico para todas las especies terrestres por vía oral, por exposición cutánea y por inhalación. Su toxicidad sobre humanos se basa principalmente en efectos neurotóxicos, incluyendo neuropatologías y la inhibición de la colinesterasa (ChE). Este compuesto es relativamente móvil en el suelo, por lo que se cree que una de las vías potenciales de disipación puede ser la lixiviación. La volatilización es otra ruta de disipación y, a pesar de que los estudios con PM indican una baja volatilización, el PM ha sido encontrado en el aire y muestras de lluvia en Estados Unidos. Además, la evaluación de riesgos ecológicos indica que es de alto riesgo para las aves, los mamíferos, peces y para insectos no blanco e invertebrados acuáticos (EPA, 2003). Sin embargo, a pesar de que su uso ha sido prohibido o restringido en varios países desarrollados y en desarrollo respectivamente, su uso sigue siendo indiscriminado en países en desarrollo. En México según la CICOPLAFEST (Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas) el PM es un plaguicida extremadamente peligroso para animales de sangre caliente (mamíferos y aves), extremadamente peligroso por inhalación, ingestión y es absorbido rápido por la piel.

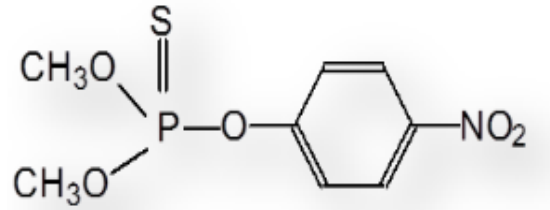


Figura 2. Estructura química del paratión metílico. Tomado de Popoca-Ursino *et al.*, 2012.

Debido al uso continuo e indiscriminado del PM para el control de plagas alrededor del mundo, su acumulación en el ambiente y su potencial neurotóxico hacia especies no blanco, incluyendo al humano, ha provocado inquietud y ha llevado a la necesidad del desarrollo de estrategias, seguras y económicas, para lidiar con su dispersión en el ecosistema (Chapalamadugu y Chaudhry, 1992). La degradación del PM mediada por microorganismos ha recibido gran atención debido a la capacidad de los microorganismos para mineralizar el plaguicida, además de que se considera uno de los factores principales que determinan el destino de estos compuestos en el ambiente (Qiu *et al.*, 2006; Fernández-López *et al.*, 2017).

2.4 Biodegradación del PM y PNF

La biodegradación es la transformación de los contaminantes en sustancias no peligrosas o menos peligrosas, mediada por microorganismos (Karigar and Rao, 2011). La mayoría de los microorganismos en especial las bacterias, se sabe, poseen habilidades para detoxificar. Estas mineralizan, transforman o inmovilizan los contaminantes (Tropel and Meer 2004).

Generalmente el primer paso en la degradación de compuestos organofosforados es la ruptura hidrolítica del enlace triéster (Rani y Lalithakumari, 1994). La mayoría de las bacterias capaces de hidrolizar el PM poseen una triesterasa comúnmente denominada *methyl paratión hidrolasa*, la cual actúa sobre el enlace triéster. La hidrólisis del PM conduce a la generación de *p*-Nitrofenol (PNF) y de ácido dimetiltiofosforico (Figura 3) (Pakala, *et al.*, 2006). Estos productos fallan como inhibidores de la acetilcolinesterasa y, por lo tanto, son menos tóxicos para los animales desarrollados. (Chaudhry *et al.*, 1988; Munnecke y Hsieh 1976; Rani y Lalithakumari, 1994). Sin

embargo, aunque el *p*-Nitrophenol (PNF) es menos tóxico que el PM para los animales superiores, muestra una mayor toxicidad hacia la microbiota (Errampalli *et al.*, 1991).

A la fecha se han aislado alrededor de 20 bacterias capaces de degradar el *p*-Nitrophenol bajo condiciones aeróbicas y se han reportado dos vías de degradación independientes. La vía comúnmente reportada en bacterias Gram positivas como *Arthrobacter sp.* JS443 (Jain *et al.*, 1994; Perry y Zilstra, 2007), *Bacillus sphaericus* cepa JS905 (Kadiyala y Spain, 1998), *Rhodococcus opacus* cepa SAO101 (Kitagawa *et al.*, 2004) y *Rhodococcus sp.* PN1 (Takeo *et al.*, 2008), donde el PNF es convertido a BT (1,2,4- benzenetriol), denominada vía BT. Por otro lado, la vía de la hidroquinona (HQ), preferentemente encontrada en bacterias Gram negativas como son *Moraxella sp.* A1 (Spain y Gibson, 1991), *Pseudomonas spp.* (Liu *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2010), que involucra la conversión del PNF a hidroquinona (HQ) vía *p*-benzoquinona (BQ) (Figura 4). Mientras que varias bacterias capaces de degradar el PM y PNF han sido aisladas de suelos contaminados, los reportes de bacterias que son capaces de degradar ambos compuestos son escasos (Pakala, *et al.*, 2006).

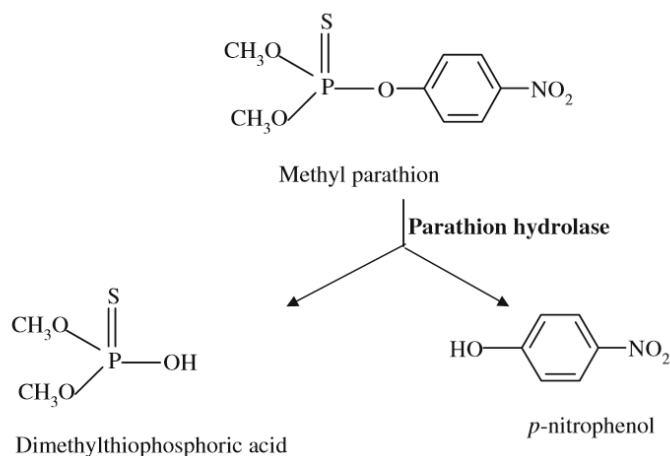


Figura 3. Hidrolisis del Paratión Metílico, reacción que produce ácido dimetil tiofosfórico y *p*-nitrofenol (Rani y Lalithakumari, 1994).

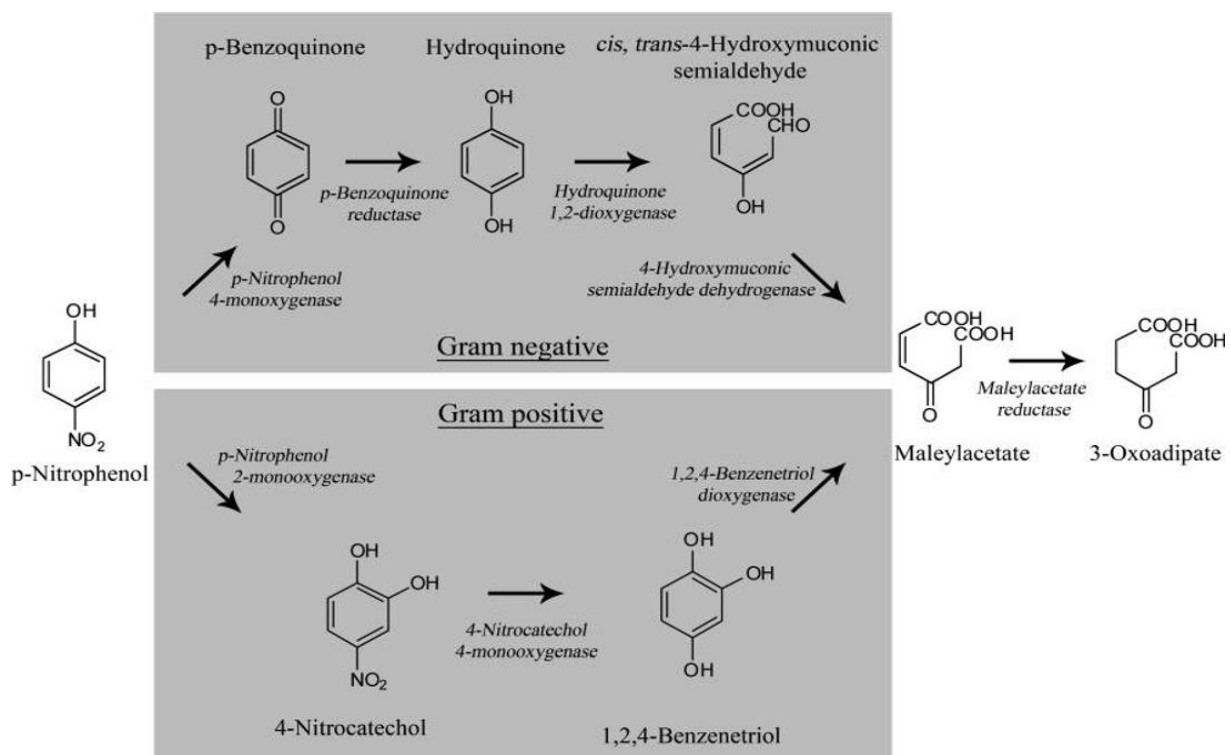


Figura 4. Diagrama que representa las dos rutas de degradación del p-Nitrofenol. Vía de la hidroquinona reportada en bacterias Gram-negativas y la vía del hidroxiquinol reportada para las bacterias Gram-positivas (Chauhan *et al.*, 2010)

Asimismo, estudios recientes reportan una variación de esta generalización, respecto a la distribución de las vías de degradación del PNF, entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Zhang *et al.*, en el año 2012, identificaron en *Pseudomonas* sp. 1-7, una bacteria Gram-negativa, que presenta el cluster *pdcABCDEFGG*. De los cuales los genes *pdcABDEFG* están involucrados en la vía HQ y los genes *pdcCG* están involucrados en la vía BT. Sin embargo, debido a que no pudieron identificar el gen que codifica para PNF monooxigenasa que cataliza la conversión del PNF en 4-NC y BT, ellos especulan que la monooxigenasa involucrada en la vía HQ tiene la habilidad de catalizar el 4-NC a BT. Resultados similares fueron observados en *Burkholderia* sp. cepa SJ98 por Vikram y colaboradores en el 2012, ellos caracterizaron y analizaron un fragmento de DNA involucrado en la degradación de PNF. El análisis de este fragmento de aproximadamente 41Kb, del cual se sabía presentaba el gen *pnpPNFC* que codifica para una deshidrogenasa benzenotriol (BtD), demostró la presencia de 5 ORF's (*pnpE2*, *pnpE1*,

pnpF, *pnpD* y *pnpC*). Más tarde se demostró que estos ORF's codifican para cinco enzimas, tres de ellas involucradas en la vía HQ, mientras que las otras dos se sabe están involucradas en la vía BT. En el 2013 Vikram y colaboradores., identificaron y caracterizaron dos ORF's, *pnpA* y *pnpB* que codifican para His-6-PnpA, involucrada en la conversión de PNP a BQ, y para la proteína His-6-PnpB involucrada en la conversión de BQ a HQ. Adicionalmente propusieron la posición de las proteínas codificadas por estos dos ORF's en la ruta de degradación del PNP. (Figura 5). En el año 2010 Shen y colaboradores investigaron la regulación de los genes involucrados en la degradación del PNP en *Pseudomonas* sp.strainWBC-3 e identificaron un gen que codifica para una proteína reguladora, el gen *pnpR* y un regulador transcripcional tipo LysR que activan la expresión de genes en respuesta a un inductor específico, es decir, demostraron que la degradación del PNP es inducida por el mismo PNF. También identificaron dos clusters de genes en *Pseudomonas putida* DLL-E4, *pnp(pnpRC1C2DECX1X2BA)* y *pnp1(pnpC1bC2bDbEbCbX1bX2b y pnpAb)*; sin embargo, no pudieron demostrar la función de estos clusters en la degradación del PNF.

A pesar de que la degradación microbiana del PM y del PNF ha sido caracterizada a niveles metabólicos y bioquímicos, se sabe poco acerca de los elementos que participan a nivel transcripcional en el proceso de su metabolización. El entendimiento del transcriptoma en presencia del PM y PNF es crucial para la interpretación funcional del genoma, revelando los constituyentes moleculares y el comportamiento de estos a diferentes tiempos, bajo la presencia de PM y PNF.

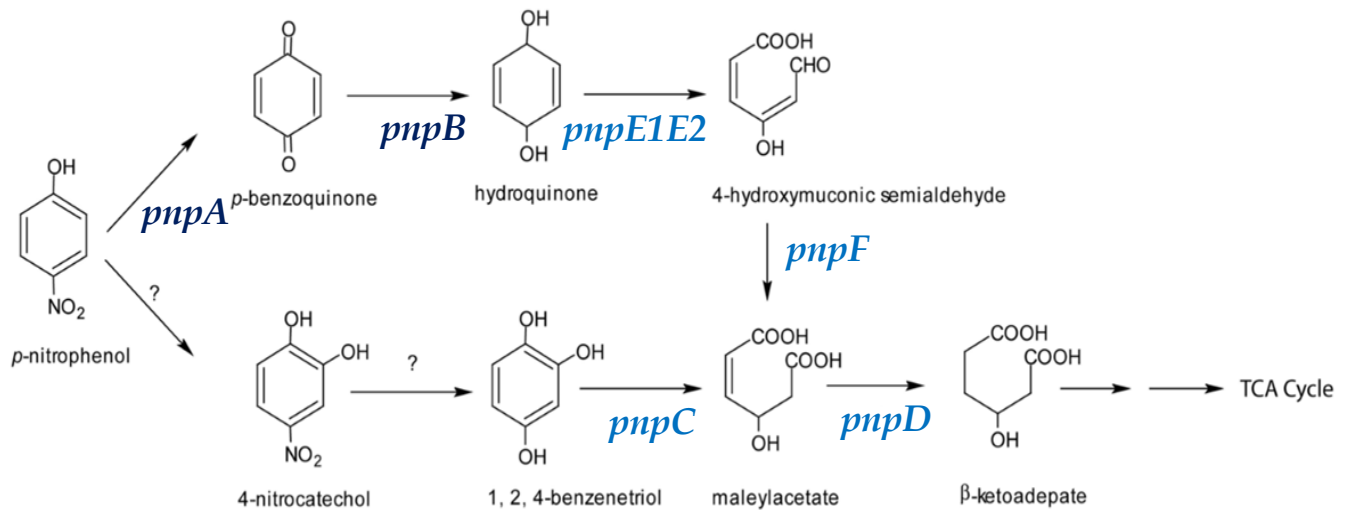


Figura 5. Genes involucrados en la derivación de PNF de *Burkholderia sp. cepa* SJ98 (modificado de Vikram *et al.*, 2012)

2.5 Transcriptoma

Con el progreso de las tecnologías de secuenciación, el número de genomas microbianos depositados en las bases de datos ha incrementado de manera acelerada; para el 2011, 1548 genomas completos de microorganismos han sido incluidos (NCBI, 2011; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>). Mientras más genomas son agregados, el entendimiento de procesos biológicos se vuelve más accesible. Debido a que la secuenciación por sí misma no aporta la información completa acerca de estos procesos, lo siguiente es la investigación basada en procesos post-genómicos, como el proteoma y el transcriptoma. El transcriptoma es la colección de todos los transcritos (RNAs) presentes en una célula en un momento particular del desarrollo celular o en condiciones fisiológicas específicas (Wang *et al.*, 2009). Entender el transcriptoma es esencial para la interpretación de los elementos funcionales del genoma y revelar los constituyentes moleculares de una célula o de un tejido. Los objetivos centrales de la transcriptómica son: catalogar las especies de transcritos, incluyendo mRNAs, RNAs no codificantes y RNAs pequeños; determinar la estructura transcripcional de los genes,

y cuantificar los diferentes niveles de expresión de cada transcrito durante el desarrollo y/o bajo condiciones diferentes.

Durante las últimas décadas, las técnicas para la evaluación de la expresión génica han presentado un gran avance en lo que respecta al volumen de datos obtenidos, el cual ha progresado de uno o unos cuantos genes, analizados por ejemplo, a través del Northern blotting o el PCR en tiempo real (RT-PCR), a analizar un mayor número de genes, a través del análisis serial de la expresión génica (SAGE), microarreglos, entre otros (Moody, 2001). Sin embargo, sólo una porción del transcrito es analizado y las isoformas son generalmente indistinguibles entre ellas. Esta desventaja limita el uso de la tecnología de secuenciación tradicional al anotar la estructura del transcriptoma (Pinto *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009). Recientemente, el desarrollo de nuevos métodos de secuenciación de DNA de alto rendimiento ha proporcionado un nuevo método para el mapeo y cuantificación del transcriptoma. Este método, denominado RNA-seq (RNA sequencing), presenta ventajas sobre los métodos anteriormente mencionados. El RNA-seq es una herramienta poderosa para el análisis de transcriptomas y, gracias a los recientes avances en las tecnologías de secuenciación, los experimentos de RNA-seq producen millones de lecturas, relativamente pequeñas, de los extremos de cDNA derivados de los fragmentos de RNA, a través de la secuenciación de segunda generación (NGS). Las lecturas obtenidas pueden ser utilizadas para una variedad de análisis, incluyendo la cuantificación de transcritos. A pesar de que los primeros estudios fueron realizados en organismos eucariontes, debido a que sus mRNAs con colas de adeninas son más fáciles de aislar, la tecnología de secuenciación del RNA también ha sido aplicada a procariontes (Van Vliet, 2010), principalmente en bacterias. Una de las ventajas del RNA-seq es que proporciona una alta cobertura y posee un amplio rango para la detección de transcritos, ya que es capaz de detectar de una a numeras copias de RNA por célula.

Los estudios basados en RNA-seq han resuelto preguntas interesantes acerca de los procesos biológicos de las células bacterianas; también han contribuido a la genómica, permitiendo una

mejor calidad en la anotación de genes. Por ejemplo, la ubicación de los genes en el genoma de referencia revela el codón de inicio de una proteína.

El estudio del transcriptoma nos acerca a la realidad a través del descubrimiento de genes, definiendo la estructura de los genes anotados, detectando las regiones no traducidas (UTRs), incluyendo los riboswitches y los sitios de unión de RNAs pequeños (sRNAs), involucrados en la regulación, y demostrando el rol de los operones en la fisiología, adaptación y en la patogenicidad de los procariontes (Sorek y Cossart, 2010).

En el 2015 Chakka y colaboradores evaluaron el rol de *orf306* (marco de lectura abierta), con actividad de esterasa, en la degradación de compuestos aromáticos, en específico del PNF. Este *orf306* fue identificado en el plásmido pPDL2 formando parte de la isla *opd*, presente en la cepa *Sphingobiumfuliginis* ATCC 27551, y expresado en la cepa *Escherichia coli* MG1655. Sorprendentemente, los estudios demostraron que las células de *Escherichia coli* MG1655 que expresaban el Orf306 eran capaces de crecer utilizando como única fuente de carbono el PNF a pesar de que previamente no se había observado esta conducta en *Escherichia coli* MG1655. Mediante el uso de *microarreglos* y qRT-PCR Chakka y colaboradores demostraron alteraciones en la expresión de genes que están involucrados en el catabolismo del carbón. En particular, un decremento significativo en la transcripción de genes que codifican para enzimas de la glucolisis y en el TCA, particularidad que se observó poco después de la inducción de Orf306. Posteriormente con el apoyo de la técnica qRT-PCR se corroboró la reducción en la expresión de la enzima fosfofructoquinasa (*pfkA*), enolasa (*eno*), y la aconitasa (*acnA*) lo cual conincidió con la represión de la glucolisis y el TCA. Además el heat map obtenido por medio del análisis del microarreglo, también reveló un incremento significativo en la expresión de genes involucrados en vías alternas del catabolismo del carbono, la vía del glyoxilato, vía del catabolismo del propionato, el ciclo del methylcitrate mostraron una inducción en presencia del Orf306. Datos que fueron corroborados con el qRT-PCR, por la cual se demostró la sobreexpresión de los genes *glcC* y *glcB*, involucrados en la vía del glyoxilato. Finalmente este estudio fue completado con diferentes experimentos para un entendimiento más profundo acerca de cómo es que las células

que expresaban Orf306 fueron capaces de adaptar su catabolismo para utilización de PNF como fuente de carbono.

Mientras que en el 2016 Chen y colaboradores evaluaron la regulación transcripcional que sufre *Pseudomonas putida* DLL-E4 durante la degradación del *para-nitrofenol*, basándose en los resultados de las técnicas RNA-seq y qRT-PCR, demostrando que la presencia del PNF en el medio inducía un cambio global en su perfil transcripcional. Primeramente se observó una regulación negativa de 2912 genes cuando *P. putida* DLL-E4 era crecida en presencia de PNF como los genes involucrados en la regulación, biosíntesis de RNA, motilidad y en la síntesis de la vitamina B12, mientras que 845 genes manifestaron una regulación positiva como los genes involucrados en la respuesta a estrés. De entre los genes regulados positivamente se observaron dos genes relacionados con RNAs no codificantes en respuesta al PNF; sin embargo, parece ser que estos dos ncRNA no son necesarios para la degradación del PNF a pesar de ser influenciados por la presencia del mismo PNF. Seguido observaron el comportamiento de los genes involucrados en la degradación del PNF, dos operones (*pnpC1C2DECX1X2* and *pnpC1bC2bDbEbCbX1bX2b*) y otros cuatro genes independientes *pnpR*, *pnpA*, *pnpB* y *pnpAb*, que se observó fueron regulados positivamente en presencia del PNF de manera significativa, a excepción de *pnpR* el cual demostraron que estaba involucrado en la regulación de *pnpA*, el cual a su vez es regulado positivamente por *pnpR* y *pnpR1* y, que además este funge como gen clave en la degradación del PNF. Por otra parte demostraron, por medio de qRT-PCR que los genes *pnpR*, *pnpC1C2DECX1X2*, y *pnpC1bC2bDbEbCbX1bX2b* no se inducían en ausencia del gen *pnpA* en presencia de PNF, dilucidando que el PNF no funge como inductor de dichos genes.

Finalmente manifestaron que los transcritos pertenecientes a los genes que codifican para enzimas para el metabolismo del PNF y para el metabolismo central del carbón cambiaron significativamente cuando las células eran crecidas en glucosa más PNF. , mientras que aquellos genes involucrados en la síntesis de proteínas ribosomales, síntesis de rRNA, RNA polimerasa y factores sigma, claramente decrecieron durante la degradación del PNF.

Posteriormente, en el 2018 Tiwari y colaboradores analizaron el rol de las modulaciones metabólicas de *Fischerella sp.*, cepa capaz de degradar el PM, que pudieran estar involucradas en la capacidad de tolerar el estrés provocado por PM, evaluando los cambios en los patrones de expresión de la cepa utilizando RT-PCR y proteómica. Durante el análisis del perfil proteico y transcripcional demostraron que la cepa *Fischerella sp.* responde de manera eficiente no sólo al estrés causado por el PM, sino que, además regula procesos biológicos indispensables para la degradación del compuesto a través de la inducción de enzimas antioxidantes, proteínas de señalización, chaperonas, peptidasas y algunas proteínas hipotéticas. Adicionalmente, gracias al análisis de expresión proteica, proponen un posible mecanismo de degradación y tolerancia al compuesto, donde están involucrados un regulador específico de dos componentes formado por dos dominios, el dominio CpxA_peri y el dominio HATPase_c que, posiblemente, transmite la señal a una proteína hipotética WP_017310637.1 ya sea directa o indirectamente, la cual debido a sus características funcionales se piensa podría ser un factor transcripcional, el cual podría estar involucrado en la inducción de diferentes proteínas de respuesta a estrés, como lo son, SOD, DnaK y peptidasas y de WP_017343813.1 cuya posible función es de hidrolasa (Anexo 5) (Lu *et al*, 2013).

3. ANTECEDENTES DIRECTOS.

En el 2012 Popoca-Ursino y colaboradores, en el laboratorio de investigaciones ambientales del Centro de Investigación en Biotecnología (CeIB-UAEM), aislaron de suelos agrícolas del municipio de Tepoztlan, Morelos, la cepa S5-2 perteneciente al género *Burkholderia*, capaz de hidrolizar el PM y de degradar el PNF por completo. Para evaluar el tiempo de degradación del PM, de su producto (PNF) y el crecimiento bacteriano, durante la degradación, se realizaron cinéticas, utilizando Medio de sales minerales y 50 ppm de PM, usando como control el cultivo en MSM sin PM. Donde se demostró la completa degradación del PM, a las tres horas de incubación, la producción de PNF y su degradación 21 horas post-inoculación (Figura 6). Durante la cinética se pudo observar un aumento en el crecimiento significativo a partir de las 15 horas de incubación.

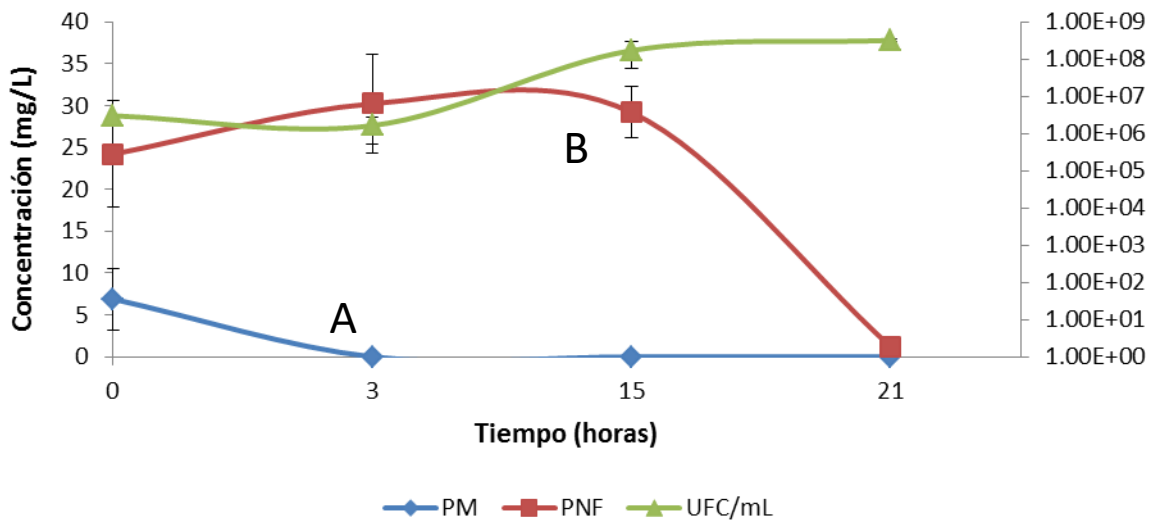


Figura 6. (A) Hidrolisis del MP, y (B) producción y degradación del PNP por la cepa S5-2. En la gráfica se muestra la concentración del MP en mg/L a lo largo de la cinética (A), el cual a las tres horas presenta una concentración de 0 mg/L. Posteriormente, se muestra el aumento en la concentración del PNP en el medio de cultivo, la cual finalmente disminuye diferencialmente a lo largo de la cinética, (B), en presencia S5-2 (Popoca-Ursino *et al.*, 2012).

Como se mencionó anteriormente, la degradación de plaguicidas mediada por microorganismos se considera una técnica segura y efectiva por lo que ha adquirido un gran interés. Sin embargo, aunque se han reportado cepas aisladas de suelos agrícolas capaces de degradar el PM y el PNF estos aún son escasos, debido a esto el estudio y el entendimiento del proceso de degradación de estos compuestos por la cepa CEIB S5-2 es de vital importancia. En el 2016, Martínez-Ocampo y colaboradores de la Universidad del Estado de Morelos y de la Universidad Nacional Autónoma de México secuenciaron y ensamblaron el genoma de la cepa CEIB S5-2. El Draft del genoma tiene 109 contigs, una longitud total de 8,976,170 bp, un contenido de C+G de 65.68% y una cobertura de ~62X. Adicionalmente, se identificó el gen 16S rRNA de *B. cenocepacia* CEIB S5-2, posteriormente se alineó con 67 cepas del género *Burkholderia* y dos secuencias más del gen 16S rRNA pertenecientes del género *Ralstonia* (grupo externo). El análisis filogenético demostró que *B. cenocepacia* CEIB S5-2, está estrechamente relacionada con *Burkholderia cenocepacia* spp, presenta una identidad del 99% y una cobertura del 100% con las cepas *B. cenocepacia* CEIB S5-1 (S5-1), *B. cenocepacia*H111 (Carlier *et al.*, 2014) y *B.cenocepacia* 869T2 (Ho y Huang, 2015). Posteriormente, los 109 contigs fueron analizados con el servidor RAST y se identificaron 8,142 marcos de lectura abierta y 8,034 secuencias codificantes. Finalmente, se identificó el cluster de genes *pnpABA'E1E2FDC* que presenta un rango positivo del 79 al 100% con las proteínas PnpABE1E2FDC de *Burkholderia* sp. SJ98 (Vikram *et al.*, 2012; Vikram *et al.*, 2013).

Más recientemente, en el año 2016 Quintero y colaboradores compararon y analizaron el proteoma de la cepa S5-2, en dos condiciones, en presencia de PM y en ausencia de PM. Para realizar las cinéticas y evaluar el crecimiento o la disminución celular y la degradación del PM y el PNF se incubó la cepa en 50 ml de MSM con una DO₆₀₀ de 0.5, concentración mayor que el experimento anterior, en presencia de PM a 50 ppm y en ausencia de este. El crecimiento celular y la concentración de PNF fueron monitoreados cada hora, simultáneamente hasta su completa degradación, mediante espectrometría utilizando una DO de 600 nm y otra DO de 410 nm, respectivamente (Figura 7). Bajo estas condiciones se demostró que la degradación del PNF se completaba en ~seis horas, a diferencia de las casi 21 horas de las condiciones anteriores.

A partir de esta cinética se escogieron tres puntos para la toma de muestras, el punto inicial (A) de la cinética en el cual se registró una concentración de 5.8 mg/L de PNF lo que sugiere el inicio de la hidrolización del PM; cabe mencionar que esta muestra fue tomada entre los cinco y diez minutos de haber colocado el PM al cultivo, a las dos horas (B) de haber comenzado la cinética donde se registró la concentración más alta de PNF y, finalmente a las cinco horas (C) post-incubación donde la concentración de PNF va disminuyendo.

Se cuantificó y analizó la concentración total proteica de 9 muestras de cada condición, cada punto con sus respectivas replicas; al realizar la cuantificación por el método de Bradford se reportó una mayor concentración en la condición con plaguicida a las cero y cinco horas respecto la condición sin plaguicida. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas al comparar la concentración total de proteínas a las dos horas post-inoculación de ambas condiciones. No obstante al analizar los geles 2D el punto con mayor presencia de proteínas fue el punto correspondiente a las dos horas en presencia de PM, con cinco spots presentes, mientras que los puntos de las cero y cinco horas mostraron un spot en presencia de PM que no se presentaba en la condición sin PM. Y finalmente, al analizar los spots presentes en ambas condiciones con el programa PDQuest el gel correspondiente a las dos horas fue el que mostró una mayor intensidad de ciertos spots en la condición con PM. Los resultados reportados por estos estudios sugieren una fuerte relación entre la expresión diferencial de genes de la cepa S5-2 en presencia del PM, reportes que despiertan una gran curiosidad por entender los procesos moleculares a los cuales recurre *B. cenocepacia* CEIB S5-2 para responder a la presencia de PM y de uno de sus productos, el PNF.

Recientemente en el Laboratorio de investigaciones ambientales, Fernández-López y colobalodaroos identificaron los genes involucrados en la hidrolisis del PM y en la degradación del PNF, ubicándolos en los contigs 38 y 39 respectivamente, a la par, obtuvo la anotación preliminar de los genes involucrados en la degradación del PNF (Anexo 2). Actualmente Salazar- Bustamante, en colaboración con el Fernández- López realizaron reacciones de PCR con DNA complementario sintetizado a partir del RNA de *B. cenocepacia* CEIB S5-2, el cual fue

extraído dos horas post-inoculación en presencia y en ausencia, para la cual utilizaron los siguientes pares de oligos *pnpAf-pnpBr*, *pnpE2f-pnpE1r*, *pnpE1f-pnpFr*, *pnpFf-pnpDr*, *pnpCf-fdxDr*, que se sabe están dispuestos de manera adyacentes, teniendo como objetivos observar la posible disposición en operón de los genes que se sabe están involucrados en la degradación del PNF y observar la expresión de dichos genes en ambas condiciones (Figura 8). Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa al 1.5%, utilizando como control positivo DNA genómico y como control negativo RNA de *B. cenocepacia* CEIB S5-2, donde, primeramente, se observó se observó una clara expresión diferencial en las reacciones correspondientes a los pares de oligos *pnpAf-pnpBr*, *pnpE1f-pnpFr*, *pnpFf-pnpDr*, *pnpCf-fdxDr*, adicionalmente se pudo demostrar la coexpresión de los genes evaluados, lo cual indica una posible disposición en operón de los genes hasta ahora evaluados.

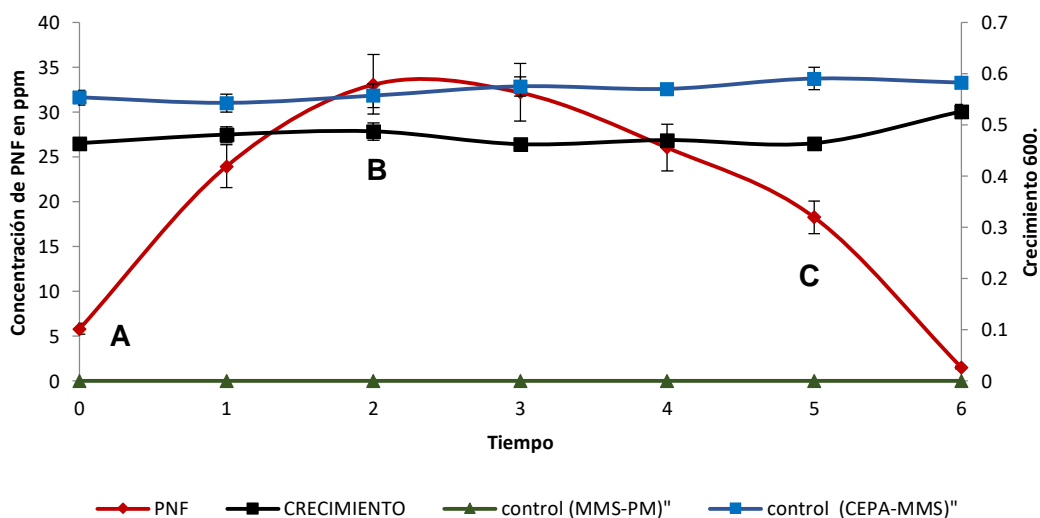


Figura 7. Concentración y degradación del PNP a lo largo de 6 horas incubación en presencia de la cepa S5-2. Durante las primeras horas de la cinética se pudo observar la acumulación de PNP, resultado de la hidrólisis del MP, alcanzando su punto máximo a las dos horas (B), a partir del cual se comenzó a observar una disminución de su concentración en medio, hasta su completa degradación a las seis horas de incubación a 30°C. Mientras que en el control (MSM-MP) no se observó generación de PNP (Quintero *et al.*, 2016).

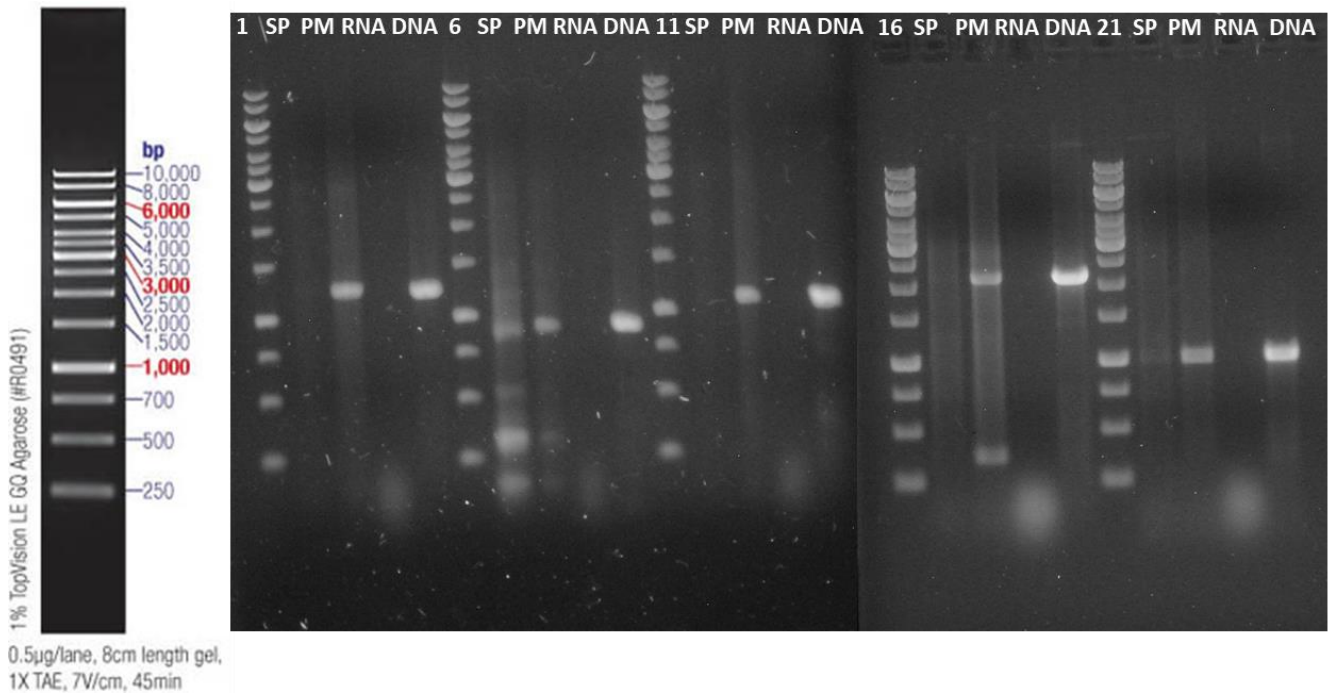


Figura 8. Definición del operón pnpABA'E1E2FDC. Se realizó una reacción de PCR, sirviendo como templado los cDNA del T2, obtenidos de ambas condiciones, utilizando los pares de oligos *pnpAf-pnpBr*, *pnpE2f-pnpE1r*, *pnpE1f-pnpFr*, *pnpFf-pnpDr*, *pnpCf-fdxDr*, utilizando como control negativo RNA y como positivo DNA genómico. En el gel de agarosa se pudo observar la coexpresión de los genes utilizados en cada reacción, además de una expresión diferenciada entre ambas condiciones, en ausencia y en presencia de PM, respectivamente. Modificada de Salazar-Bustamante y Fernández-López 2017.

4. JUSTIFICACIÓN

La hidrólisis del PM y degradación del PNF han sido estudiadas ampliamente y, dos vías de degradación del PNF han sido descritas: la vía de la hidroquinona (HQ) y la vía del hidroquinol (BT). No obstante, aunque las vías de hidrólisis y degradación del PM y PNF han sido extensamente caracterizadas a niveles moleculares y bioquímicos, se sabe muy poco del proceso y regulación transcripcional involucrada en la degradación del PNF.

Los métodos para secuenciación del ADN han hecho posible el analizar la expresión de genes bajo diferentes condiciones ambientales (transcriptoma). Particularmente la transcripción es un paso esencial en la expresión de genes y su comprensión 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.

El estudio de la regulación transcripcional durante la hidrólisis y degradación del PM y PNF, respectivamente, es de vital importancia para lograr comprender la correlación que existe entre la expresión transcripcional y el proceso de degradación del PM. Lo cual proporcionará una visión general de la respuesta provocada por la presencia de ambos compuestos.

Entender la expresión de genes que coordina la respuesta a la biodegradación del PM puede ayudar a identificar muchos procesos biológicos. El análisis de los cambios en la expresión de genes que acompaña a la exposición de la bacteria al PM, ayudará a caracterizar las posibles perturbaciones en la transcripción de genes y conocer los mecanismos moleculares involucrados en la degradación de los plaguicidas.

5. HIPÓTESIS

Si la cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2 tiene la capacidad para degradar al PM, lo cual le proporciona una condición fisiológica específica, entonces se presentarán cambios transcripcionales en presencia o ausencia del PM y se podrán cuantificar los diferentes niveles de expresión de cada transcrito durante la degradación de dicho plaguicida.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Analizar los cambios transcripcionales de la cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2, en presencia y en ausencia de paratión metílico.

6.2. Objetivos particulares

1. Analizar el transcriptoma de la cepa S5-2 en tres diferentes tiempos en presencia de PM.
2. Identificar los genes sobreexpresados y reprimidos como respuesta al PM y proponer su probable mecanismo de regulación.
3. Definir las principales vías metabólicas sobrerrepresentadas en presencia del PM.

7 METODOLOGÍA

7.1. Condiciones de cultivo

Tres cultivos independientes de la cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2 se incubaron de 12-13 horas con agitación (150 rpm), a una temperatura de 30°C en 250mL de Caldo de Soya Trypticaseina, alcanzando una densidad (DO_{600}) óptica de aproximadamente 1.0. Posteriormente se colectó la pastilla celular proveniente de cada cultivo por medio de centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. La pastilla celular obtenida fue lavada con Medio de Sales Minerales (MSM), cuya composición en g/L es: K_2HPO_4 , 0.82; KH_2PO_4 , 0.19; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.20; KNO_3 , 2.0; $(NH_4)_2SO_4$, 0.99. Inmediatamente, cada una de las pastillas fue resuspendida en 5ml de MSM. Finalmente, cada pastilla fue utilizada como inóculo de seis matraces, correspondientes a las cero horas, dos y cinco horas respectivamente, con un total de 18 Erlenmeyer de 250ml, cada uno con 50ml de MSM estéril y una DO_{600nm} de 0.5. De los 18 matraces con MM a nueve matraces se les agregó 50ppm de PM y los nueve restantes fueron utilizados para la condición control, en ausencia de PM.

7.2 Toma de muestra

El MSM de seis de los 18 matraces, correspondientes a las cero horas, fue colectado en tubos Falcon de 50ml adicionados con 400 µl de solución RNAlater de manera inmediata después de la inoculación y la adición de PM. Posteriormente la biomasa total se colectó por centrifugación a 3,500 rpm por 10 min a 4°C. Los 12 cultivos restantes fueron incubados a 30°C con agitación constante a 150rpm. Seis matraces fueron colectados a las dos horas post-inoculación y finalmente seis matraces a las cinco horas post-inoculación y fueron guardadas a -70°C para su uso posterior. La colecta se realizó de acuerdo a lo mencionado por Quintero y colaboradores, a las cero horas, inicio de la hidrólisis del PM, a las dos horas donde se reportó la concentración más alta de PNF, uno de los productos de la hidrólisis del PM y finalmente a las cinco horas,

donde la concentración de PNF ya ha disminuido de manera significativa respecto a las dos horas (Quintero *et al.*, 2016; Figura 7).

7.3. Extracción de RNA

La extracción del RNA total de cada uno de los puntos de muestreo se realizó por el método de TRIzol-Cloroformo (TriReagent de Zymo Research), de acuerdo al protocolo del Kit TRI Reagent®. Posteriormente, de cada muestra, se utilizaron 30 µg para ser procesados con 5µl del enzima DNAsa I (Thermo Scientific), para eliminar el DNA presente en las muestras. Acto seguido, las muestras fueron sometidas a limpieza, utilizando las columnas “RNA Clean and Concentrator” de la marca Zymo Research. Finalmente, para la evaluación de la integridad y concentración del RNA total se tomaron 5 µl, la concentración de RNA fue determinada por la medición de su absorbancia utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 200c (Thermo Scientific) y paralelo, la integridad del RNA fue determinada por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Mientras que el resto de la muestra fue guardada a -70°C, y posteriormente se enviaron a la compañía GENEWIZ Solid Science. Superior Service en Nueva Jersey, Estados Unidos (<https://www.genewiz.com>), donde se evaluó la calidad y concentración de las muestras, y la eliminación de los RNA ribosomales, para la construcción de las librerías y su posterior secuenciación utilizando el Sistema de Illumina NextSeq 2x150 bp 2000. Más tarde se evaluó la calidad de la secuenciación y se realizó la depuración de datos para los análisis correspondientes.

7.4. Análisis y mapeo de los datos del RNA-seq

Los datos obtenidos por el RNA-seq se procesaron con el programa FastQC, para la obtención del valor de calidad de las secuencias, además de la eliminación de los adaptadores y la filtración de secuencias de baja calidad con el programa Cutadapt. Posteriormente las secuencias fueron alineadas contra el draft del genoma de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 (DDBJ/EMBL/GenBank bajo el número de acceso LNCR000000000), como genoma de referencia, utilizando el programa CLC

Genomics Server v. 10.0.1 para inferir que transcritos están siendo expresados, el alineamiento obtenido será visualizado utilizando el software IGV (Thorvaldsdóttir *et al.*, 2013), y finalmente se realizó la normalización de las lecturas obtenidas para el análisis de expresión diferencial entre ambas condiciones, en presencia y en ausencia de PM.

7.5 Clasificación funcional

El progreso en la secuenciación de genomas ha llevado a un enriquecimiento en las proteínas reportadas en bases de datos con una variedad de secuencias proteicas deducidas, muchas de ellas sin un rol funcional documentado. Es por eso que, con el fin de profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares, la clasificación funcional de los genes es una herramienta de búsqueda de suma importancia. La biología computacional (bioinformática) tiene como objetivo extraer la mayor información posible de estas secuencias, clasificándolas de acuerdo a sus relaciones homologas, prediciendo, de esta manera, sus posibles funciones bioquímicas y/o funciones celulares e incluso su origen evolutivo. Existen varias clasificaciones funcionales tales como: COG y KEGG (Aguilar *et al.*, 2012; Tatusov *et al.*, 2000; Tatusov *et al.*, 1997).

7.5.1 Clasificación por COG (Grupos de genes ortólogos)

El sistema de clasificación por COG permite la anotación funcional y filogenética de genes basándose en el concepto de “ortólogo”. Para la clasificación se utilizó la base de datos de IMG/M (INTEGRATED MICROBIAL GENOMES & MICROBIOMES) de JGI (Joint Genome Institute) utilizando el genoma de *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 con identificador 2724679034 (Aguilar *et al.*, 2012; Tatusov *et al.*, 2000; Tatusov *et al.*, 1997).

7.5.2 Clasificación por KEGG (Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas) para la asignación de vías metabólicas

La clasificación por KEGG permite el análisis de las funciones de los genes basándose en las redes de genes por medio de diagramas gráficos de procesos bioquímicos, como la representación de vías metabólicas (<https://www.genome.jp/kegg/>). Para el análisis de las vías metabólicas de *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 se utilizó como genoma de referencia a *Burkholderia* sp. RPE67 (Aguilar et al., 2012).

7.6 PCR cuantitativo (qRT-PCR)

Finalmente, se realizó la síntesis de cDNA a partir de 2 µg de RNA total tratado con DNasa, de los tiempos cero, dos y cinco horas, utilizando el Kit RevertedAid H minus First Strand cDNA Syntesis (Thermo Scientific). Cada reacción se realizará por triplicado biológico y técnico. El cDNA de cada muestra se utilizó para análisis de expresión transcripcional de los genes de interés, entre ellos los involucrados en la degradación del PNF, *pnpABA'E1E2FDC*, de ambas condiciones por medio de qRT-PCR, utilizando como control endógeno al gen *rpoD*, cuyo producto es el factor sigma 70, debido a que presenta una expresión constitutiva a lo largo del experimento y como control positivo y el control negativo el RNA total y DNA genómico, respectivamente, de la cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2. Ulteriormente, el nivel de expresión de los genes seleccionados se calculó por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando el gen *rpoD* como control endógeno.

8. RESULTADOS

8.1 Cinética de crecimiento de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 y degradación del PNF

Se realizó la cinética de crecimiento y degradación, utilizando medio MSM y PM, usando como control medio MSM sin PM. Se midió la densidad óptica a 600nm y a 410nm para el monitoreo del crecimiento celular y generación y degradación del PNF (producto de la hidrólisis del PM), respectivamente. Al comienzo de la cinética (T0), la cual, cabe mencionar, corresponde a 5-10 minutos de exposición a PM, se obtuvo una densidad óptica de ~1.0 a 410nm que corresponde a una concentración de 8.20 mg/L de PNF; posteriormente, se obtuvo una lectura aproximada de 2.0 a 410nm que corresponde a una concentración de 33.45 mg/L a las 2hrs post-inoculación, tiempo en el que Quintero y colaboradores en 2016 reportaron la mayor concentración de PNF y finalmente a las 5hrs de incubación se observó una lectura de 1.03 a 410nm, demostrando una disminución significativa en la concentración de PNF, con respecto a las 2hrs, la cual corresponde a 6.49 mg/L (Figura 9). Por otro lado en las muestras control, en ausencia de PNF, no se observaron cambios significativos entre los puntos de muestro de la cinética. El aumento en la concentración del PNF indica la hidrólisis del PM y la producción de PNF y su posterior decremento en la concentración demuestra la degradación del compuesto por parte de *B. cenocepacia* CEIB S5-2.

Durante la cinética, el crecimiento de la cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2, aparentemente, no fue afectado de manera significativa por la presencia de PM. Asimismo en la condición control no se observaron cambios significativos en el crecimiento de la *B. cenocepacia* CEIB S5-2. No obstante, la mayor disminución en las lecturas a 600nm se observaron a las 2hrs (T2) de incubación en presencia de PM, que corresponde al punto de muestreo con la concentración de PNF mas alta, situación que podría deberse a la toxicidad que ejerce el PNF sobre la bacteria.

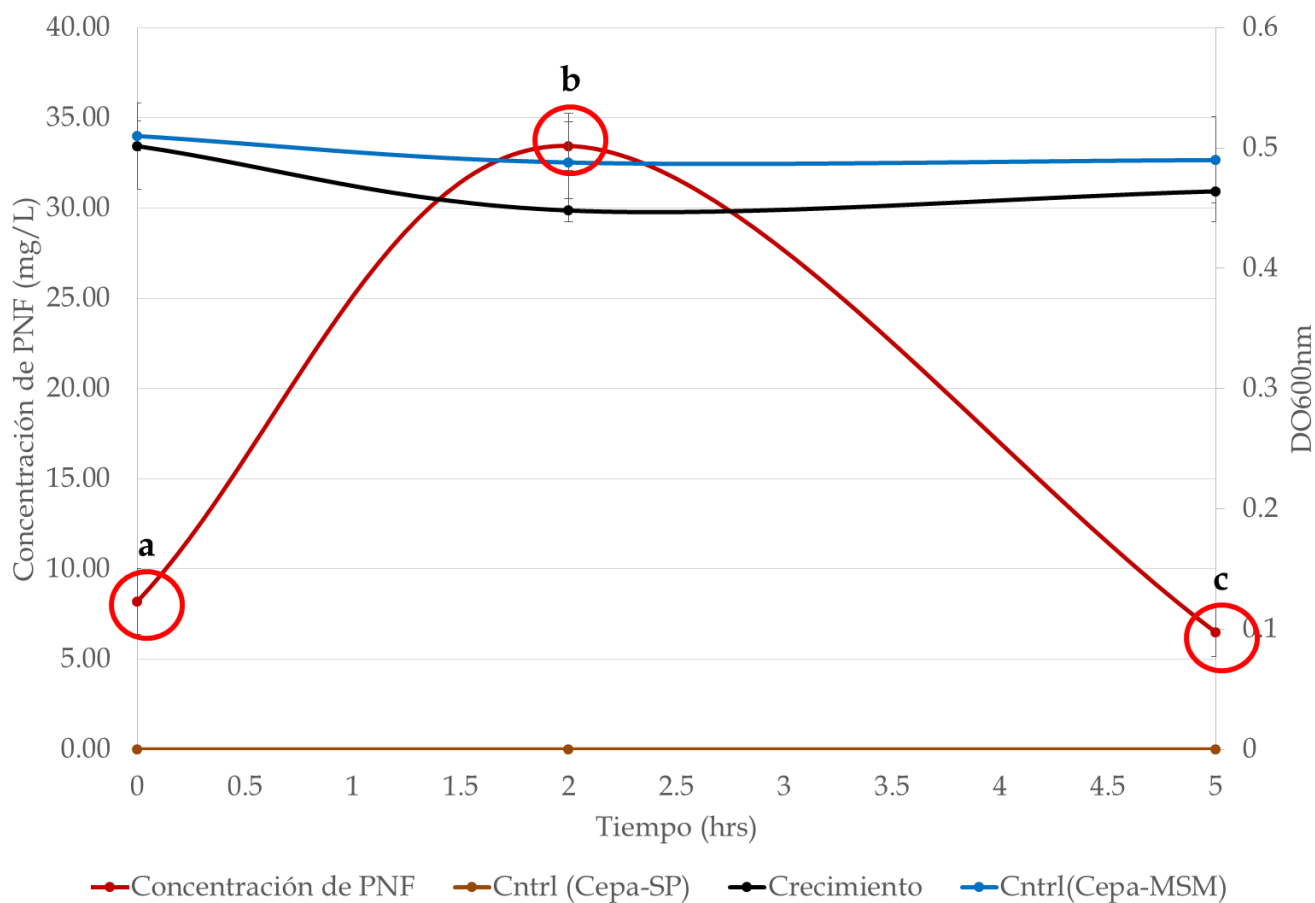


Figura 9. Cinética de crecimiento y degradación del PM y el PNF. La gráfica muestra la concentración de PNF, siendo las dos horas post-inoculación el punto con una mayor concentración de PNF (b) y posteriormente a las cinco horas se observa una disminución drástica en la concentración de PNF (c).

Entre tanto, a las 5hrs de incubación en la condición problema, en presencia de PNF, se observó un aumento aparente en las lecturas a 600nm, fenómeno que no se observó en la condición control, donde claramente se manifiesta un decremento constante en el crecimiento de la cepa durante toda la cinética. El aparente incremento en el crecimiento de la cepa en presencia de PNF, puede deberse a que la cepa está utilizando como fuente de carbono al PNF, a pesar de la toxicidad que se ha reportado para este compuesto. Sin embargo, de momento, con los resultados aquí reportados, no se puede asegurar si el PNF esté siendo utilizado como fuente de

carbono o si la cepa esté siendo afectada por la toxicidad del PNF. Por otro lado los controles, MSM inoculado con *B. cenocepacia* CEIB S5-2 en ausencia de PM utilizados en la presente cinética, no presentaron cambios significativos a lo largo de la cinética.

Las 18 muestras monitoreadas para la realización de la cinética fueron colectadas y centrifugadas en tubos Falcon de 50 ml, adicionados con 400µl de RNA *later* para la posterior extracción de RNA.

8.2 Extracción de RNA

La concentración del RNA total de las muestras, cuantificada por nanodrop, osciló entre los 1,000 y los 6,000 ng/µl (Anexo 2). Por otro lado el análisis de la integridad del RNA total de cada muestra, realizado por medio de electroforesis en geles de agarosa, no demostró degradación de RNA por lo que se procedió a su tratamiento con DNase para la eliminación de DNA (Figura 10).

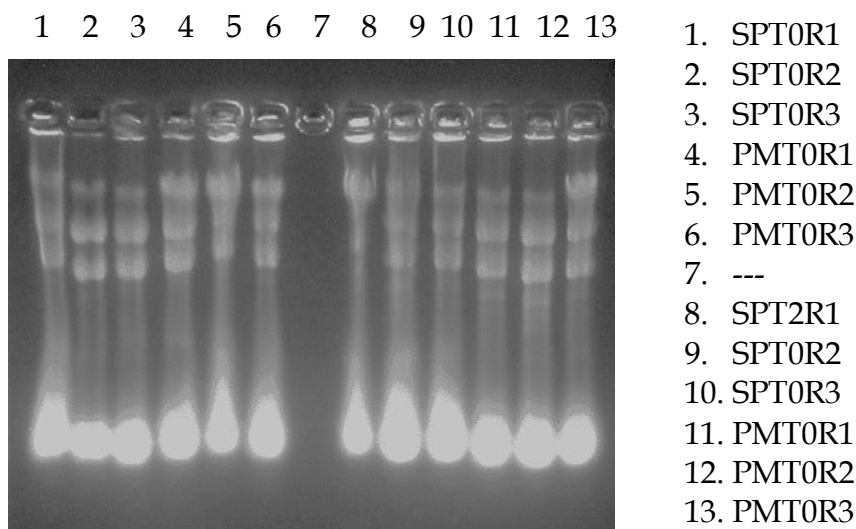


Figura 10. Gel representativo del RNA total correspondiente a *B. cenocepacia* CEIB S5-2 en presencia (PM) y ausencia (SP) de paratión metílico, al tiempo inicial (T0) y dos horas (T2) post-incubación, respectivamente, de cada réplica, réplica 1 (R1), réplica 2 (R2) y réplica 3 (R3).

Las lecturas en Nanodrop demostraron una concentración final que osciló entre los 150 a 60 ng/ μ l, mientras que la concentración mínima solicitada por la empresa GENEWIZ fue de ≥ 50 ng. A pesar de que la concentración de la réplica tres sin PM fue la muestra con menor concentración de RNA total, fue suficiente para ser analizada (Anexo 3). Por otro lado, el análisis por electroforesis del RNA total tratado, no mostró degradación como se muestra en la figura 11, a excepción del carril 14 donde se puede observar una menor cantidad de RNA y una posible degradación. Posterior a la evaluación de concentración e integridad del RNA total se realizaron reacciones de PCR para evaluar el tratamiento con DNAsa. En la figura 12 se muestra un gel representativo de los productos de las reacciones de PCR, de los carriles dos al ocho se utilizó RNA total como templado para la reacción, no se observaron bandas, mientras que en el carril nueve se utilizó DNA, correspondiente al control positivo, se observó una banda correspondiente al producto de PCR, por lo que se descartó la posible presencia y/o contaminación de las muestras con DNA. Este procedimiento se realizó con las 18 muestras para asegurar la ausencia de DNA en cada una de las muestras.

Finalmente, a partir del RNA total, libre de DNA, se sintetizó cDNA de los tiempos cero, dos y cinco horas, el cual se utilizó para análisis preliminares sobre la expresión transcripcional de los genes involucrados en la degradación del PNF de ambas condiciones, por medio de PCR.

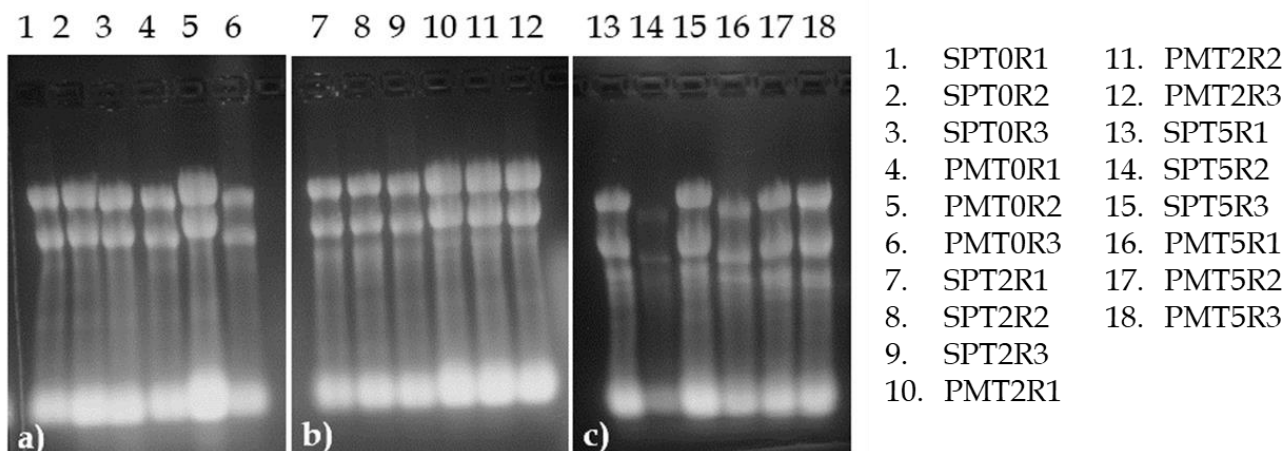


Figura 11. RNA total tratado con DNAsa. Electroforesis de RNA en geles de TBE al 0.5X para observar la integridad de cada una de las 18 muestras, nueve con MP y 9 sin MP (SP). El panel a) corresponde a las cero horas (T0), el panel b) a las dos horas (T2) y el panel c) a las cinco horas (T5) post-inoculación, con sus respectivas replicas (R1, R2 y R3).

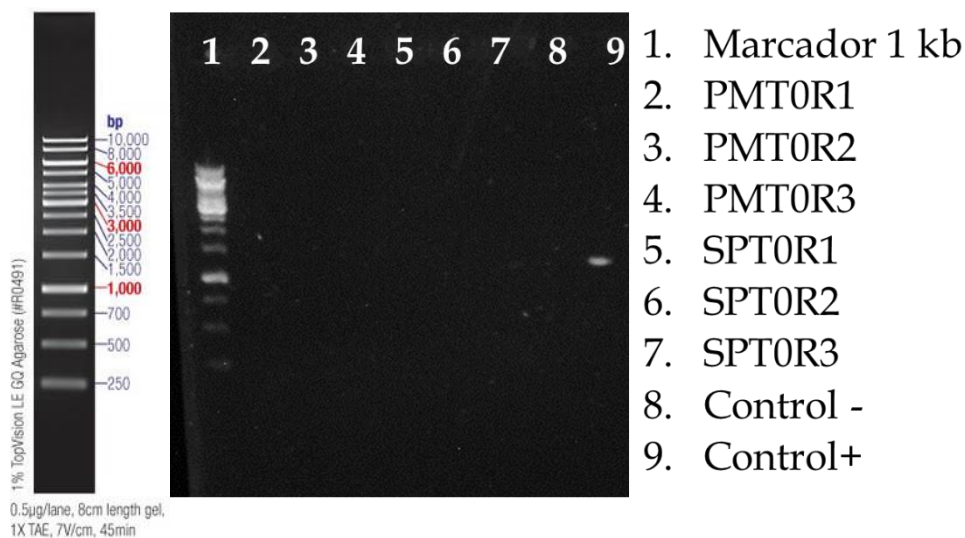


Figura 12. Electroforesis de los productos de PCR. Gel representativo de muestras de RNA procesadas con DNAsa. De los carriles 2-8 se utilizó de templado RNA del tiempo cero, para el control positivo se utilizó DNA genómico de *B. cenocepacia* CEIB S5-2.

En la figura 13 se muestra la expresión de los genes *pnpA* y *pnpB* en presencia y ausencia de PM, del tiempo dos horas, donde se observa la expresión de estos genes únicamente en presencia de PM, motivo por el que se especula que la expresión de dichos genes es inducida por la presencia del PNF en el medio, asimismo no se observó ninguna banda en el carril correspondiente al control negativo (RNA total) por lo que se corroboró la ausencia de DNA en las muestras.

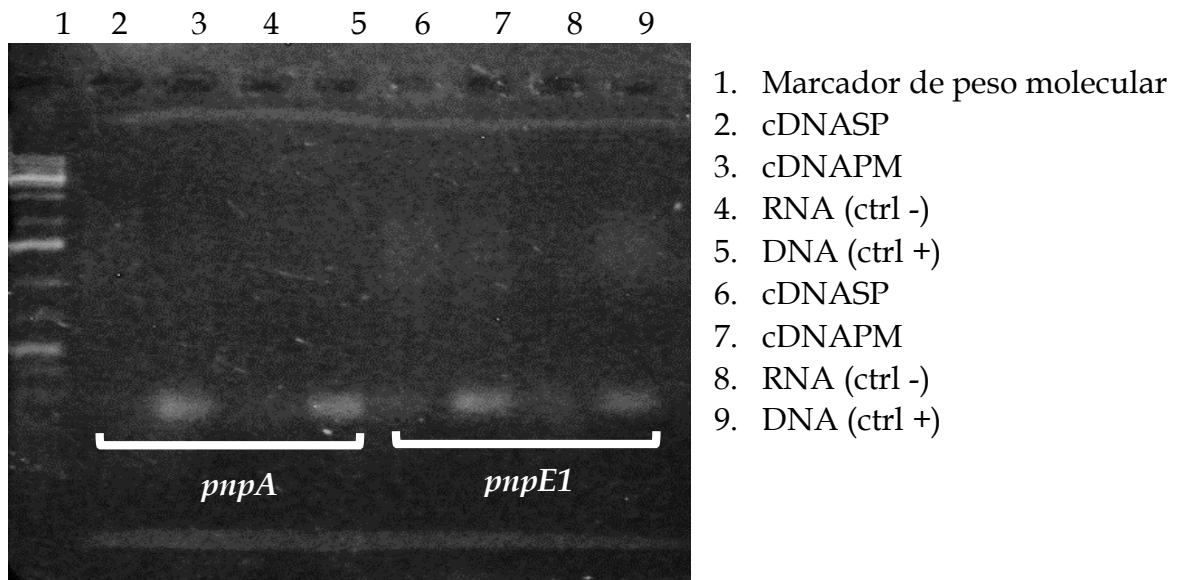


Figura 13. Expresión de los genes *pnpA* y *pnpE1* en ausencia (SP) y en presencia de (PM) de paratión metílico, respectivamente, utilizando como control negativo el RNA y como positivo el DNA de la cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2.

Adicionalmente, se evaluó la coexpresión de los genes *pnpE2f-pnpE1r*, *pnpCf-fdxDr* de los tiempos cero y dos horas. En los carriles uno y dos de la figura 14a, correspondientes al par de oligos *pnpE2f-pnpE1r*, se observaron varias bandas en ambas condiciones, resultados que concuerdan con lo reportado por Salazar- Bustamante y Fernández-López en 2017 (datos no publicados). Sin embargo, en la condición con PM se percibe una mayor expresión de la primera banda, la cual presenta un peso molecular de aproximadamente 907 pb, la cual posteriormente es la única banda que se advierte en el tiempo cinco horas (carril 10). Por otro lado en los carriles tres y cuatro, correspondientes a los genes *pnpCf-fdxDr*, no se observó ninguna banda en ambas condiciones, correspondientes al tiempo dos horas, mientras que en el tiempo cinco horas, en la

condición con PM, correspondiente al carril 12 se observa claramente una banda, la cual no se percibe en la condición contraria.

Los resultados del presente análisis demostraron una expresión, de la mayoría de los genes, sólo en presencia de PM, como ya se había mencionado anteriormente, motivo por el cual se intuye que su expresión podría estar regulada por el PNF, producto de la hidrólisis del PM o por los intermediarios, productos de la degradación del PNF. Sumado a esto, con los análisis de la coexpresión de los genes se demostró una probable disposición de los genes en operón. Más tarde se realizaron reacciones de PCR en las cuales se utilizaron los oligos correspondientes a los genes *pnpA'f-pnpE1r*, *pnpE2f-pnpFr*, *pnpE1f-pnpDr* y *pnpE2f-pnpDr*, que corresponden a fragmentos de ~1481, ~1860, ~3115 y ~3914, con el fin de analizar cuáles son los genes que se encuentran formando parte de un operón, o en dado caso si todos forman parte de un mismo operón (Figura 14). De manera similar a los experimentos previamente realizados, sólo se observó la expresión de los genes en presencia de PM, contrario a la condición sin PM donde no se observaron bandas. Por otro lado en el carril 11, correspondiente a los pares de oligos *pnpE2f-pnpDr*, no se observó una banda. La usencia de producto en el carril 11 se podría deber al tamaño de producto esperado, debido a que en la reación anterior si se observa la expresión en presencia de PM donde se utilizan los oligos *pnpE1f* y *pnpDr*, además de que Salazar-Bustamante y Fernández-López demostraron una coexpresión de los genes *pnpE2f-pnpE1r*, dato que se corroboró en este trabajo de investigación.

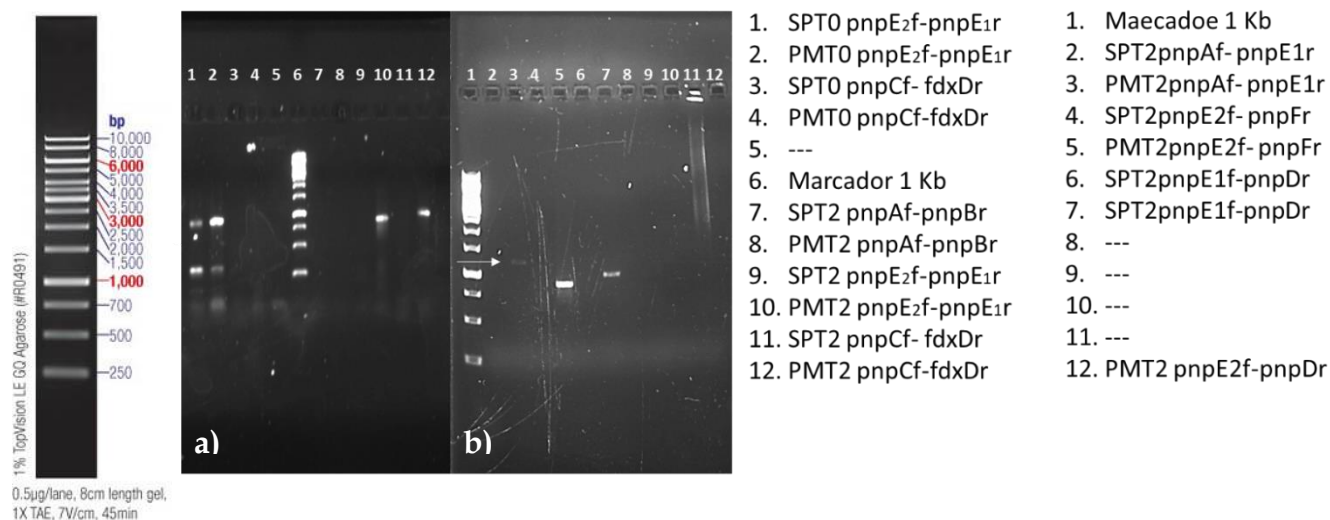


Figura 14. RT-PCR punto final. Amplificación de algunos genes involucrados en la degradación del PNP (a) *pnpA'f-pnpBr*, *pnpE2f-pnpE1r*, *pnpCf- fdxDr* y (b) los oligos *pnpAf-pnpE1r*, *pnpE2f-pnpFr*, *pnpE1f-pnpDr* y PMT2 *pnpE2f-pnpDr* en presencia y en ausencia de PM.

8.3 Análisis e integridad del RNA total

La secuenciación y análisis de las lecturas, se realizaron en la empresa GENEWIZ. Las muestras de RNA totales fueron cuantificadas y analizadas para evaluar la concentración del RNA por fluorescencia (Qubit™) y la integridad de las muestras por medio de electroforesis de capilaridad (Bioanalyzer), método por el cual se obtuvo un gel de electroforesis, además de un electroferograma que proporciona el número de integridad del RNA (RIN) basado en un sistema numérico que va del 1-10, siendo el 10 el perfil más intacto. En la figura 15 se muestra el gel donde se observa que la mayoría de las muestras están dentro de los parámetros de integridad, siendo el más alto de 8.9, correspondiente a la réplica dos del tiempo cero horas en ausencia de PM, y el más bajo de 6.8 correspondiente al tiempo cinco horas, replica dos en presencia de PM.

En la figura 16 se muestran dos electroferogramas representativos, los cuales corresponden a las muestras con el RIN más alto y bajo respectivamente, donde se muestra la concentración de las

muestras y el tamaño de los fragmentos correspondientes a las subunidades 23S y 16S. Por ultimo las lecturas obtenidas por Illumina NextSeq fueron sometidas a control de calidad para filtrar las lecturas de baja calidad. Más tarde, las lecturas filtradas fueron alineadas al genoma de *B. cenocepacia* S5-2 (IMG ID 112226). Finalmente para la búsqueda de genes expresados diferencialmente (GED's), se realizaron análisis de componentes principales (PCA) y otros análisis de correlación para el procesamiento de los datos obtenidos (Anexo 6 y 7). El programa DESeq2 fue utilizado para identificar los GED's entre condiciones. Los GED's fueron definidos de acuerdo al criterio de $\log_2 \geq 1.5$ y un $p \geq 0.05$, donde el \log_2 indica las "veces de cambio" y la "p" indica la probabilidad (Love *et al.*, 2014).

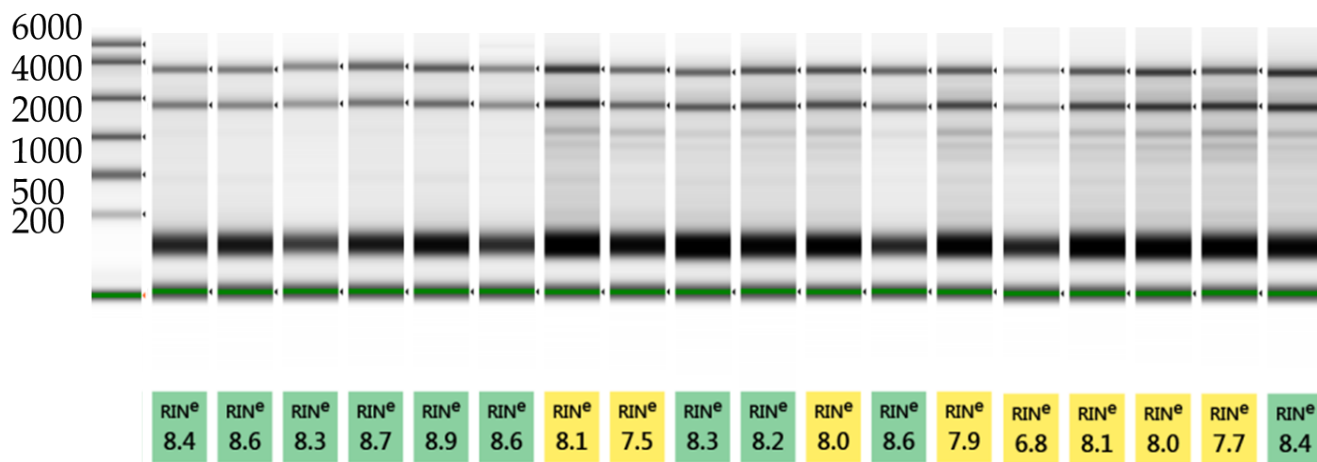
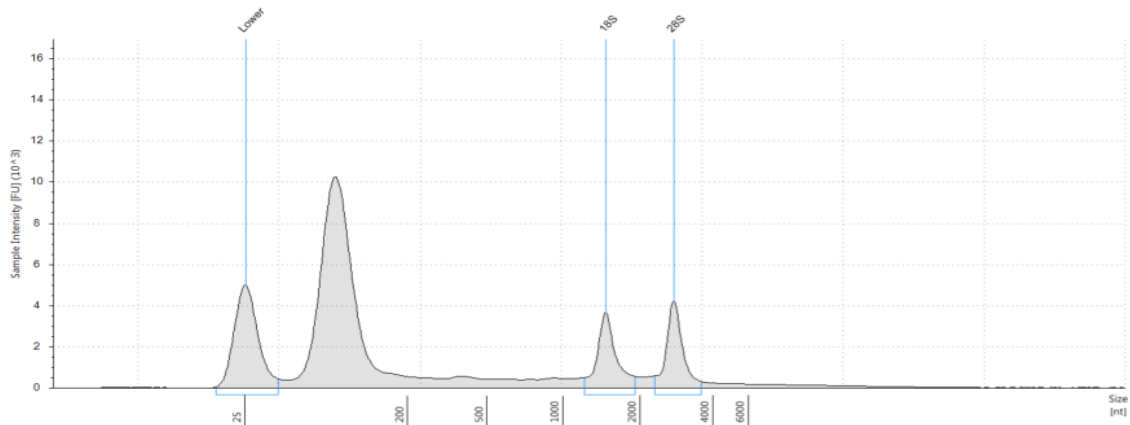


Figura 15. Imagen representativa de los 18 RNA analizadas por "RNA ScreenTape" de Agilent. Carril 1 Marcador Electrónico, seguido de las muestras de RNA de *B. cenocepacia* CEIB S5-2.

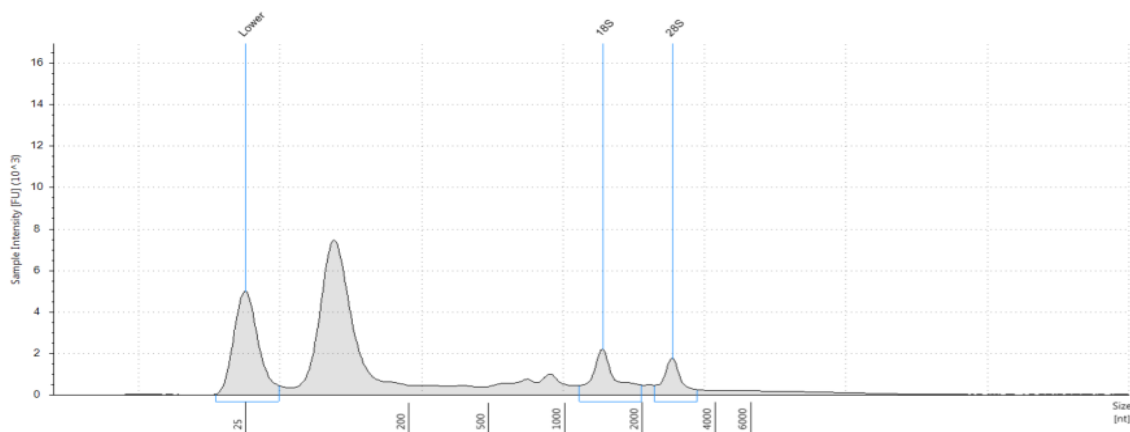


Sample Table

Well	RINe	28S/18S (Area)	Conc. [ng/ul]	Sample Description	Alert	Observations
H3	8.9	1.0	104	ES23-23		

Peak Table

Size [nt]	Calibrated Conc. [ng/ul]	Assigned Conc. [ng/ul]	Peak Molarity [nmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	40.0	40.0	4710	-		Lower Marker
1468	11.9	-	23.9	49.62		18S
2744	12.1	-	13.0	50.38		28S



Sample Table

Well	RINe	28S/18S (Area)	Conc. [ng/ul]	Sample Description	Alert	Observations
A5	6.8	0.6	76.4	ES32-32		

Peak Table

Size [nt]	Calibrated Conc. [ng/ul]	Assigned Conc. [ng/ul]	Peak Molarity [nmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	40.0	40.0	4710	-		Lower Marker
1405	8.63	-	18.1	62.20		18S
2676	5.24	-	5.76	37.80		28S

Figura 16. Electroferogramas representativos de dos de las 18 muestras de RNA.

8.4. Expresión diferencial de genes

Se identificaron siete genes expresados diferencialmente en el tiempo inicial, 166 genes en el tiempo dos horas y finalmente 232 GED a las cinco horas, en presencia de PM, mientras que los GED en la condición control fueron, cero para el tiempo inicial, 90 GED en el tiempo dos horas y 143 en el tiempo cinco horas. De los GED, 141 genes se compartieron en presencia de PM, entre los tres tiempos, de los cuales siete corresponden a los GED del tiempo inicial, mientras que en la condición control 23 genes se compartieron entre el tiempo dos y el tiempo cinco horas, no se reportaron GED compartidos entre los tres tiempos debido a que no se observó ningún gen expresado diferencialmente en el tiempo cero horas (Figura 17). Adicionalmente, entre la condición control, ausencia de PM, y en presencia de PM no se compartieron GED, lo que sugiere que *B. cenocepacia* CEIB S5-2 responde de manera diferente al estrés ejercido por cada condición. De los GED se observó la inducción de varias proteínas hipotéticas y proteínas de función desconocida, representando el 29% de los GED en el tiempo inicial, el 22% del tiempo dos horas y el 21% del tiempo cinco horas, en presencia de PM. Reportes que se han observado en otros estudios, como en el análisis del transcriptoma de *P. putida* DLL-E4 en presencia de PNF y en *E. coli* en presencia de glifosato, donde se reportan altos porcentajes de proteínas hipotéticas o de función desconocida. En este trabajo, en la condición control el 17% y el 27% de los GED corresponden a proteínas hipotéticas y de función desconocida para los tiempos dos y cinco horas respectivamente. Asimismo en la condición con PM se observó una mayor inducción de genes involucrados en la regulación transcripcional con nueve elementos y 13 elementos en presencia de PM, que corresponden al 5% y al 6% de las dos y cinco horas respectivamente, mientras que en ausencia de PM, en el tiempo dos horas se observó la inducción de un elemento, que corresponden al 1%, y finalmente tres elementos para el tiempo cinco horas que corresponde al 2% de los GED. Lo que sugiere que el proceso de degradación de PM y de su producto PNF requiere de una regulación transcripcional compleja y que, al igual que lo reportado por Chen y colaboradores en el año 2016 y Chakka y colaboradores en 2015, esta regulación transcripcional no se limita sólo a la regulación de los genes involucrados en la degradación del PNF, sino a todo un conjunto de procesos tanto metabólicos y transcripcionales. De igual manera, en

presencia de PM se observó la inducción de bombas de eflujo, porinas permeasas, transportadores involucrados en la resistencia a miltidrogas con respecto a la condición control, además de la inducción de catalasas y citocromos (Tabla 3).

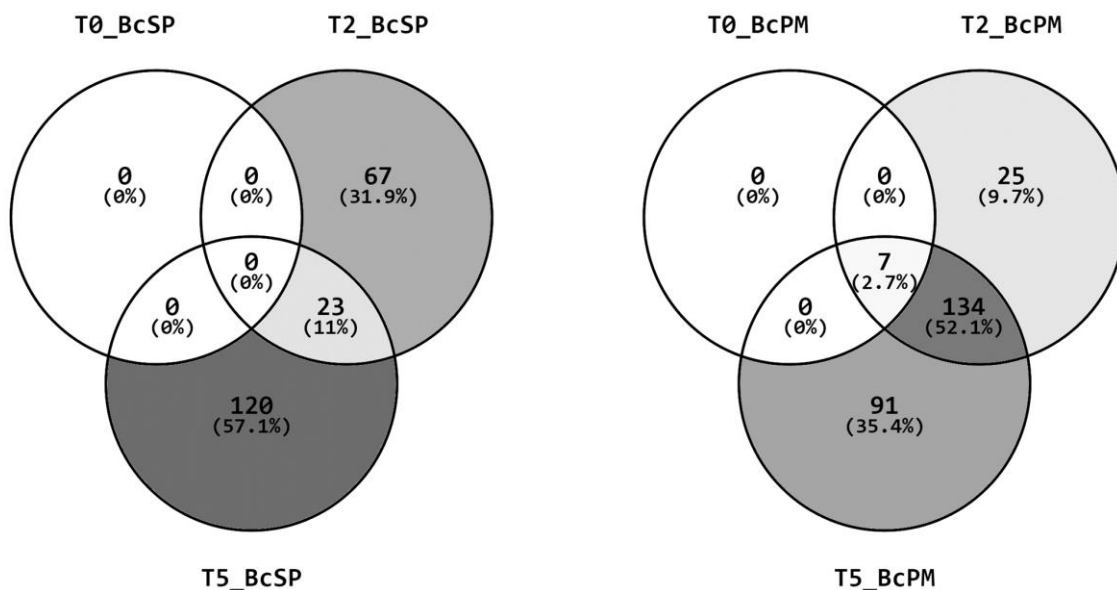


Figura 17. Diagrama de Ven que muestra la distribución de los genes expresados diferencialmente detectados por DESeq de cada tiempo y genes compartidos entre los tres tiempos de cada condición. a) Genes totales de ambas condiciones; b) genes expresados en presencia de PM y c) genes expresados en ausencia de PM. No se encontraron genes compartidos entre condiciones.

Tabla 3. Características generales del perfil transcripcional de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 en presencia y ausencia de PM.

Tiempo de muestreo	Genes expresados diferencialmente (GED)		Proteínas hipotéticas		Reguladores transcripcionales	
	PM	SP	PM	SP	PM	SP
0	7	0	29%	0%		0%
2	166	90	22%	17%	5%	1%
5	232	143	21%	27%	6%	2%

8.5 Clasificación funcional

8.5.1 Categorización funcional de acuerdo al COG y análisis de la anotación funcional

Los GED's de cada tiempo fueron categorizados de acuerdo con sus categorías funcionales del COG. Para el tiempo inicial, las categorías funcionales representativas en presencia de PM fueron: Transcripción [K], Transporte y metabolismo de carbohidratos [G] y Transporte y metabolismo de coenzimas [H], cada una representando el 14%, representando el 43% de los GED's mientras que el 57% restante no se agrupó en ninguna categoría. En ausencia de PM no se observó expresión diferencial significativa.

A las dos horas de cultivo, los GED's, en presencia de PM, pertenecen principalmente a seis categorías funcionales: i) Producción y conservación de energía [C], con 16 elementos (9.64%), entre tanto que, en ausencia de PM, sólo 6 elementos correspondieron a este COG representando el 6.67%; ii) Transcripción [K], con 13 elementos que corresponden al 7.83% de los GED's en presencia de PM, y en ausencia de PM, sólo se reportaron dos elementos que corresponden al 2.22% de GED's; iii) Transporte y metabolismo de coenzimas [H], 10 elementos en presencia de PM (6.02%) y un elemento sin PM (1.115% de los GED's); iv) Transporte y metabolismo de carbohidratos [G] con nueve elementos (5.42%) en presencia de PM, y tres elementos en ausencia de PM que correspondieron a este COG (3.33%). En contraste, en ausencia de PM los COG's más representativas fueron: i) Motilidad celular [N] con 25 elementos (27.78%) y dos elementos en presencia de PM (1.20%) y, finalmente, ii) Transporte y metabolismo de aminoácidos [E] con siete elementos en ausencia de PM, que corresponden al 7.78% de los GED's y con dos elementos en presencia de PM (1.20%). Entre tanto, el 47% en presencia de PM, correspondieron a las categorías funcionales de función desconocida [S] y de predicción de función general [R] además de no pertenecer a ningún COG. En contraste con la condición sin PM el 33% de los GED corresponden a las categorías S, R y a genes que no pertenecen a ningún COG.

A las cinco horas, las categorías funcionales mayormente representadas fueron: i) Producción y conservación de energía [C], con 21 elementos (9.05%) en presencia de PM y seis elementos, en ausencia de PM, 4.20% de los GED's; ii) Transcripción [K], con 17 elementos expresados significativamente con PM representando el 7.33% de los GED's y solamente tres elementos en ausencia de PM (2.10%) con siete elementos para la condición control que corresponden al 7.78% de los GED's; iii) Transporte y metabolismo de coenzimas [H], con 11 elementos expresados en presencia de PM (4.74%), y un elemento en ausencia de PM (0.70%). En la categoría de Transporte y metabolismo de carbohidratos [G], al contrario del tiempo dos horas, el número de elementos en presencia de PM fue de 17 (7.33%), mientras que en ausencia de PM se expresaron 19 que correspondieron al 13.29% de los GED's. Adicionalmente, para la categoría de Motilidad celular [N], sólo se expresaron tres elementos en presencia de PM, pero sin PM no se expresó ningún elemento correspondiente a esta categoría (Figura 17). Finalmente el 41% de los genes, en presencia de PM, correspondieron a las categorías de función desconocida y de predicción de función general, o no se encontraban en ningún COG. En tanto que en ausencia de PM el 36% de los GED's correspondían a las categorías funcionales [S] y [R] o no presentaban COG. Estos resultados sugieren que *B. cenocepacia* CEIB S5-2 recurre a procesos biológicos que aún no han sido caracterizados, a pesar de que los genes involucrados en las vías de degradación de PM y PNF y, las mismas vías, han sido ampliamente estudiadas (Figura 17).

En la tabla 4 se muestran las principales categorías funcionales en los tres tiempos de muestreo, así como en las dos condiciones experimentales con y sin PM. Se observa un mayor número de GED's en presencia de PM como son producción y conservación de energía [C], transporte y metabolismo de coenzimas [H], transcripción [K] y predicción de función general [R]; todos ellos después de haberse llevado a cabo la hidrólisis y cuando el PNF se está degradando (después de 2 y 5 horas, respectivamente). Además, a las dos horas de cultivo se observa una sobreexpresión de los genes responsables de la motilidad en ausencia de PM, lo que podría deberse al estrés de la bacteria en ausencia de una fuente de carbono.

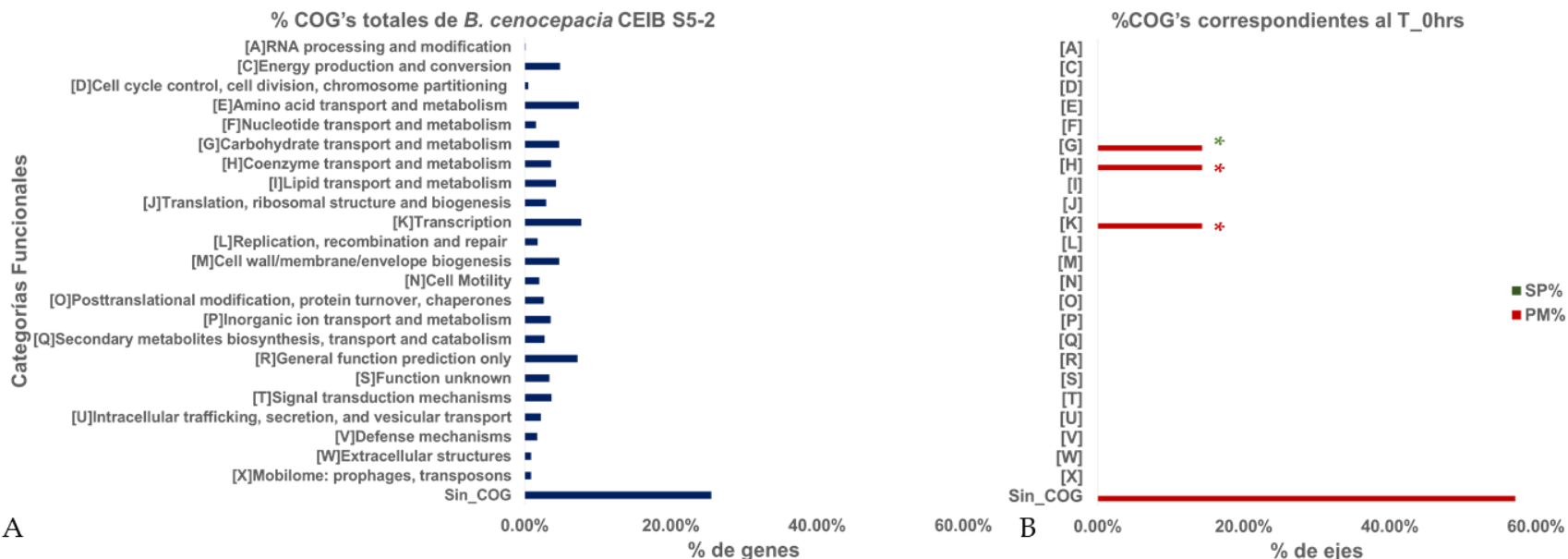


Figura 18. Distribución de los COG's en *B. cenocepacia* CEIB S5-2. En el panel A se observan los COG's totales. En el panel B, C y D se observan los COG's representativos de cada tiempo. Los asteriscos en rojo indican el COG's sobrerrepresentado en los tres tiempos en presencia de PM; en color negro se indican los representativos en ausencia de PM y en verde los COG'S representativos en ausencia de PM.

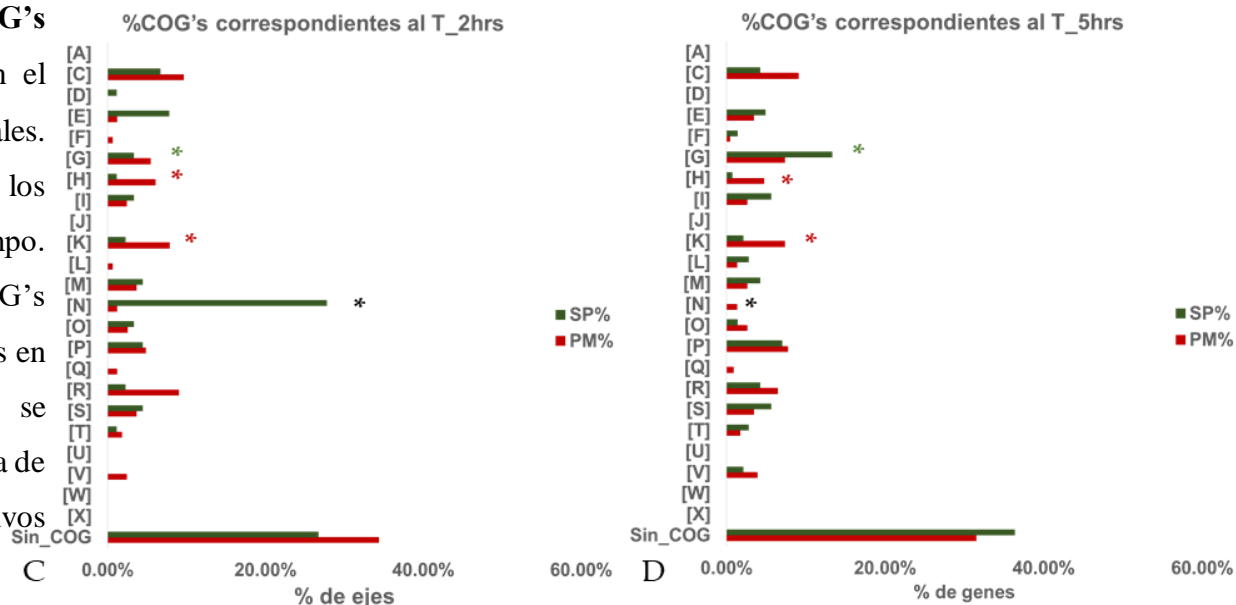


Tabla 4. COG's principales de B. cenocepacia CEIB S5-2 a las 0, 2 y 5 horas

Principales COG's (COG's ID)	Función	Tiempo de muestreo (hrs)	Condición	Número de GED's	%
[C]	Producción y conservación de energía	0	PM	-	-
			SP	-	-
		2	PM	16	9.64%
			SP	6	6.67%
		5	PM	21	9.05%
SP	3		4.20%		
[E]	Transporte y metabolismo de aminoácidos	0	PM	-	-
			SP	-	-
		2	PM	2	1.20%
			SP	7	7.78%
		5	PM	8	3.45%
SP	3		4.90%		
[G]	Transporte y metabolismo de carbohidratos	0	PM	1	14%
			SP	-	-
		2	PM	9	5.42%
			SP	3	3.33%
		5	PM	17	7.33%
SP	19		13.29%		
[H]	Transporte y metabolismo de coenzimas	0	PM	1	14%
			SP	-	-
		2	PM	10	6.02%
			SP	1	1.115%
		5	PM	11	4.74%
SP	1		0.70%		
[K]	Transcripción	0	PM	1	14%
			SP	-	-
		2	PM	13	7.83%
			SP	2	2.22%
		5	PM	17	7.33%
SP	3		2.10%		
[N]	Motilidad celular	0	PM	-	-
			SP	-	-
		2	PM	2	1.20%
			SP	25	27.78%
		5	PM	3	1.29%
SP	-		-		
[S]	Función desconocida	0	PM	-	-
			SP	-	-
		2	PM	6	3.61%
			SP	4	4.44%
		5	PM	8	3.45%
SP	4		5.59%		
[R]	Predicción de función general	0	PM	-	-
			SP	-	-
		2	PM	15	9.04%
			SP	2	2.22%
		5	PM	15	6.47%
SP	4		4.20%		

8.4.2 Anotación funcional por Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

Posteriormente, los GED de ambas sometidos a análisis en KEGG, utilizando a *Burkholderia* sp. RPE67 como cepa de referencia. En el tiempo inicial el 29% de los GED presentaron KO's, mientras que para el tiempo dos y cinco horas para los GED en presencia de PM el 32% y 46% presentaron KO's, respectivamente. En tanto, que en ausencia de PM los GED que se ubicaron en vías metabólicas mediante KEEG fue el 59% y el 38%, respectivamente.

De los KO's identificados para el tiempo inicial en presencia de PM, sólo uno fue ubicado en KEGG, que corresponde a la vía de degradación de compuestos aromáticos. Para el tiempo dos, las vías metabólicas únicas para la condición con PM fueron: i) Metabolismo del glutatión, ii) Metabolismo del Piruvato, ii) Degradación de ácidos grasos, iii) Síntesis y degradación de cuerpos cetónicos, iv) Degradación de Valina, Leucina e isoleucina, v) Metabolismo del propanoato, vi) Degradación de compuestos aromáticos, mientras que las vías sobrerrepresentadas fueron: i) Sistema de dos componentes, ii) Degradación del benzoato, iii) Metabolismo del Triptófano, iv) Metabolismo del glutatión, v) Metabolismo del butanoato. En cambio en ausencia de PM las vías metabólicas únicas fueron: i) los transportadores ABC, ii) Metabolismo del metano, iii) Biosíntesis de antibióticos y iv) Biosíntesis de aminoácidos. Por último, para el tiempo cinco horas las vías metabólicas únicas en presencia de PM correspondieron a: i) Degradación de lisina, ii) Degradación del benzoato, iii) Metabolismo del glutatión, iv) Metabolismo del azufre, v) Metabolismo del alanina, aspartato y glutamato, vi) Biosíntesis de monobactam, vii) Síntesis y degradación de cuerpos cetónicos, viii) Degradación de ácidos grasos, ix) Metabolismo de ácidos grasos. Mientras que el sistema de dos componentes, el metabolismo del butanoato, el metabolismo del Glioxilato y dicarboxilato, el metabolismo del triptófano, y el metabolismo del propanoato se vieron sobrerrepresentados en presencia de PM. En contraste, en ausencia de PM, las vías metabólicas únicas fueron: i) Fijación de carbono en organismos fotosintéticos, ii) Vía de pentosas fosfato, iii) Metabolismo del metano y iv) Metabolismo del almidón y sacarosa (Figuras 18 y 19).

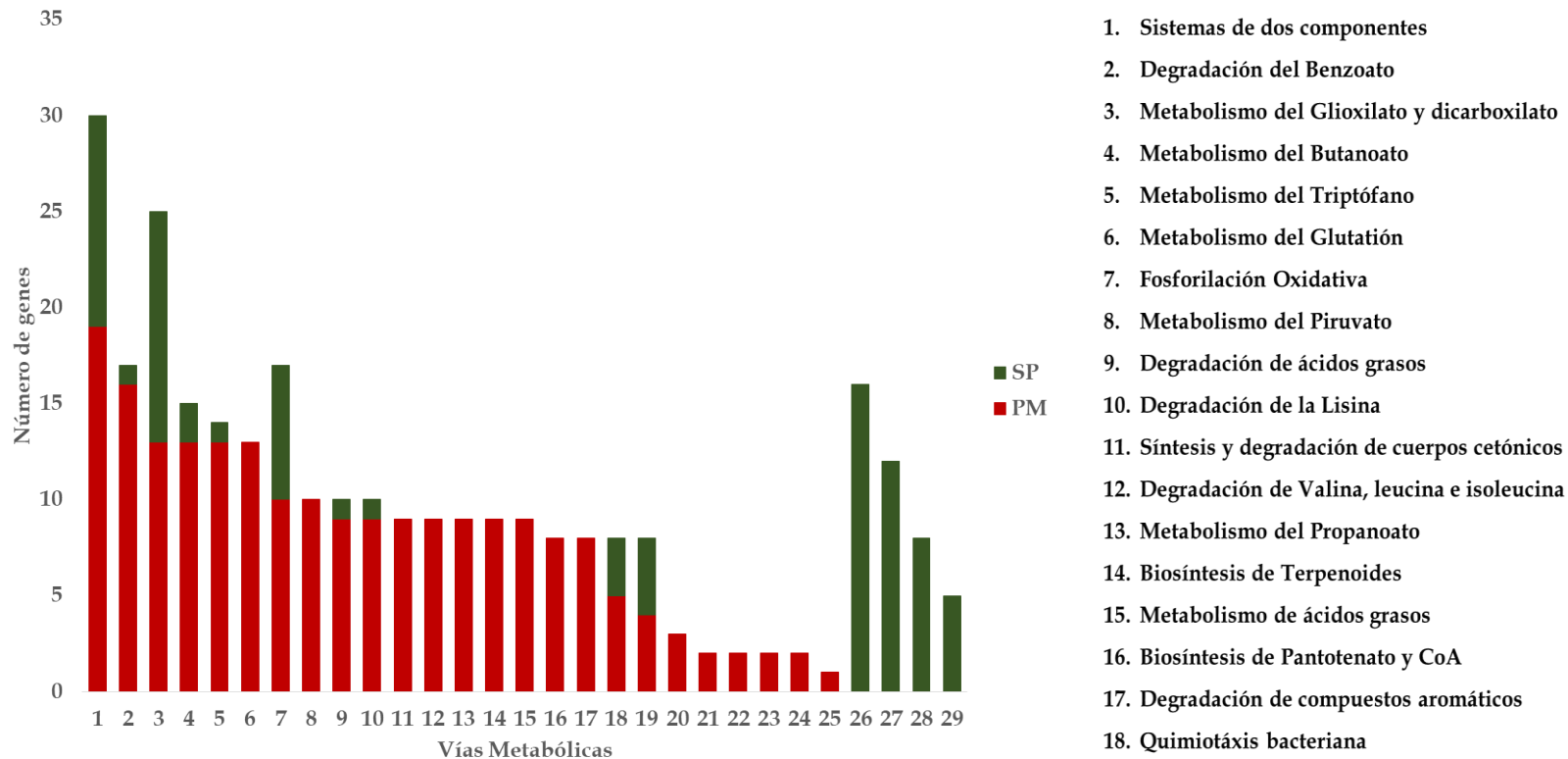


Figura 19. Distribución de los DEG's de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 en los mapas de KEGG a las dos horas de incubación, a las dos horas de incubación, en las vías de KEGG, expresados en porcentaje. Las barras de color rojo representan los genes expresados en MP, mientras que las barras de color verde representan la condición en ausencia de MP. Las vías metabólicas están representadas con número.

1. Sistemas de dos componentes
2. Degradación del Benzoato
3. Metabolismo del Glioxilato y dicarboxilato
4. Metabolismo del Butanoato
5. Metabolismo del Triptófano
6. Metabolismo del Glutatión
7. Fosforilación Oxidativa
8. Metabolismo del Piruvato
9. Degradación de ácidos grasos
10. Degradación de la Lisina
11. Síntesis y degradación de cuerpos cetónicos
12. Degradación de Valina, leucina e isoleucina
13. Metabolismo del Propanoato
14. Biosíntesis de Terpenoides
15. Metabolismo de ácidos grasos
16. Biosíntesis de Pantotenato y CoA
17. Degradación de compuestos aromáticos
18. Quimiotaxis bacteriana
19. Ciclo de los ácidos Tricarboxílicos (TCA)
20. Metabolismo de Riboflavina
21. Glicólisis y Gluconeogénesis
22. Biosíntesis de ubiquinona y otros terpeoides-quinona
23. Biosíntesis de Estreptomicina
24. Biosíntesis de unidades de azúcares pliquetidas
25. Metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato
26. Transportadores ABC
27. Metabolismo del Metano
28. Biosíntesis de antibióticos
29. Biosíntesis de aminoácidos

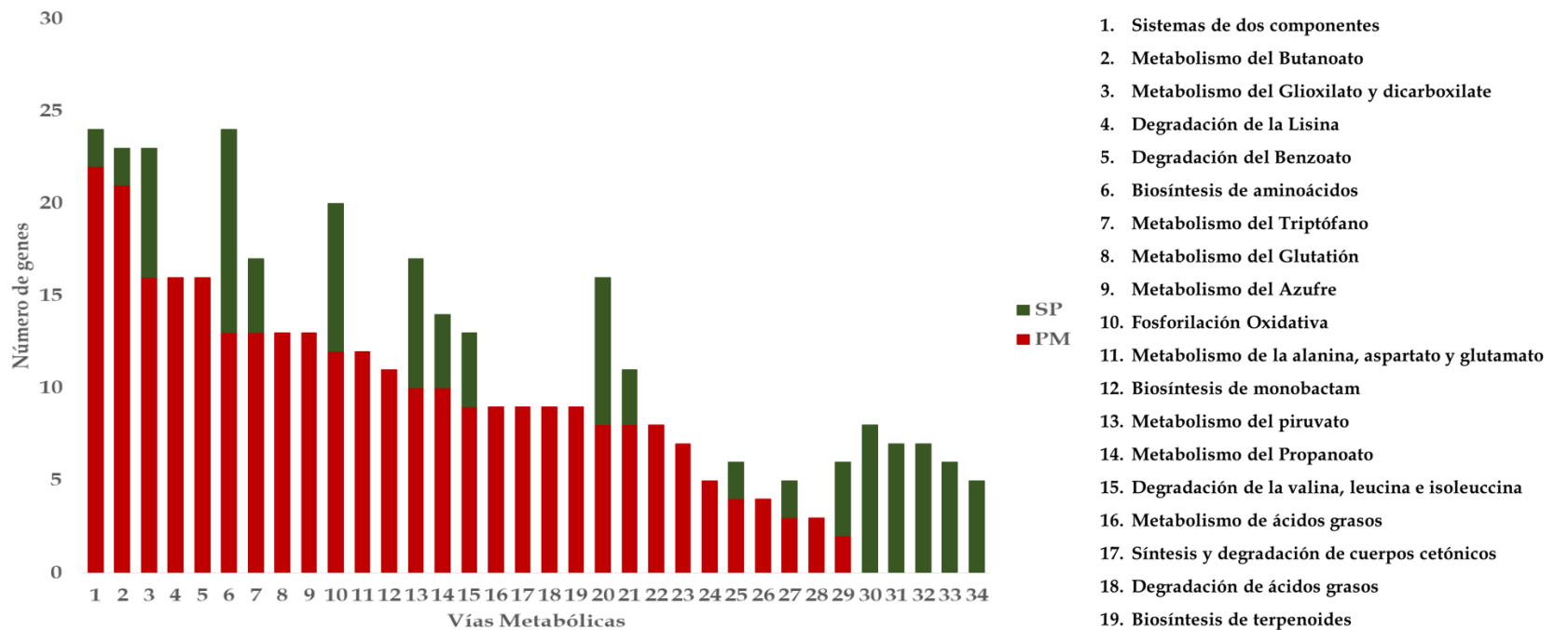


Figura 20. Distribución de los DEG's de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 en los mapas de KEGG a las cinco horas de incubación, en las vías de KEGG, expresados en porcentaje. Las barras de color rojo representan los genes expresados en MP, mientras que las barras de color verde representan la condición en ausencia de MP. Las vías metabólicas están representadas con número.

1. Sistemas de dos componentes
2. Metabolismo del Butanoato
3. Metabolismo del Glioxilato y dicarboxilato
4. Degradación de la Lisina
5. Degradación del Benzoato
6. Biosíntesis de aminoácidos
7. Metabolismo del Triptófano
8. Metabolismo del Glutatión
9. Metabolismo del Azufre
10. Fosforilación Oxidativa
11. Metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato
12. Biosíntesis de monobactam
13. Metabolismo del piruvato
14. Metabolismo del Propanoato
15. Degradación de la valina, leucina e isoleuccina
16. Metabolismo de ácidos grasos
17. Síntesis y degradación de cuerpos cetónicos
18. Degradación de ácidos grasos
19. Biosíntesis de terpenoides
20. Biosíntesis de Pantotenato y CoA
21. Transportadores ABC
22. Degradación de compuestos aromáticos
23. Metabolismo del nicotinato y la nicotinamida
24. Quimiotaxis bacteriana
25. Ciclo de los ácidos Tricarboxílicos (TCA)
26. Metabolismo del Nitrógeno
27. Metabolismo de la Fructuosa y manosa
28. Metabolismo de Riboflavina
29. Glicólisis y Gluconeogénesis
30. Vía de las Pentosas Fosfato
31. Metabolismo del metano
32. Metabolismo del almidón y la sucrosa
33. Recombinación no-homologa
34. Metabolismo de azúcar amino y azúcar nucleotídica

Existen algunos estudios acerca de los cambios en el perfil transcripcional de ciertos microorganismos en presencia de PNF. Como se mencionó anteriormente, Chen y colaboradores en 2016 reportaron cambios globales en el perfil transcripcional de *P. putida* DLL-E4 provocados por la exposición a PNF, incluyendo cambios en el metabolismo del carbono, donde observaron que enzimas claves en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) fueron sobreexpresadas, resultando en la sobrerrepresentación de esta vía en presencia de glucosa y PNF, en comparación a la condición control, en la cual sólo era expuesta a glucosa; entre tanto que la vía de las pentosas fosfato fue reprimida en presencia de PNF. Por otro lado, el análisis transcripcional de *E. coli*, la cual expresaba un ORF ubicado cerca del gen *oph* perteneciente al plásmido pPDL2 de *S. fuliginis*, que codifica para una organofosfato hidrolasa, demostró represión de enzimas claves del TCA en presencia de PNF sin la adición de glucosa, además de la represión de ciertas enzimas claves involucradas en la glicólisis, mientras que las vías del propionato, el ciclo del metilcitrato y la vía del glioxilato se observaron sobrerrepresentadas en presencia de PNF, de igual manera sin la adición de glucosa. De acuerdo con estos datos, el perfil transcripcional de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 demostró una sobrerrepresentación del metabolismo del glioxilato en presencia de PM, sin embargo, esta diferencia se comienza a observar hasta el tiempo cinco horas, mientras que en el tiempo dos horas no se observa ningún cambio entre ambas condiciones. Respecto al TCA no se observó sobrerrepresentado en el tiempo dos horas, es hasta el tiempo cinco horas donde se comienza a observar una mayor representación del TCA en presencia de PM, en tanto que la vía de pentosas fosfato si presenta cambios entre condiciones, siendo una de las vías únicas para la condición control a las cinco horas. Por otra parte en los tiempos dos y cinco horas se observa la expresión de genes involucrados en degradación de compuestos aromáticos, condición única para la condición en presencia de PM.

Más recientemente el análisis transcripcional de *E. coli*, incapaz de crecer en presencia de glifosato un herbicida organofosforado, demostró que la presencia de este herbicida inhibía varios genes clave involucrados en el metabolismo central del carbono, afectando así la capacidad glicolítica. Durante la exposición se reprimieron vías como Pentosas fosfato, el TCA,

glioxilato y la gluconeogénesis. Como ya se mencionó antes, el TCA este no se ve afectado en *B. cenocepacia* CEIB S5-2 en presencia de PM, como se observa en el perfil de *E. coli*, además, la vía del glioxilato a pesar de no estar sobrerrepresentada en el tiempo dos horas no se ve afectada en presencia de PM, como sucede con *E. coli*, y posteriormente para el tiempo cinco horas se comienza a ver sobrerrepresentada; en tanto que la gluconeogénesis, a pesar de que es única para la condición en presencia de PM a las dos horas de exposición, para el tiempo cinco horas se observa una mayor sobrerrepresentación en ausencia de PM. Finalmente la represión de la vía de Pentosas fosfato se observó en ambas bacterias, en *E. coli* y en *B. cenocepacia* CEIB S5-2, la cual no presentó ningún elemento expresado significativamente en presencia de PM y es hasta las cinco horas donde se observa la sobrerrepresentación de esta vía en ausencia de PM, por lo que se especula que la represión de esta vía está vinculada a la presencia de un compuesto organofosforado. Adicionalmente, en *E. coli* se observó un incremento en los niveles de transcripción de los genes involucrados en motilidad celular y quimiotaxis en presencia de glifosato debido a que este actúa como “repelente”, mientras que en *B. cenocepacia* CEIB S5-2 los genes de flagelo, un aparato complejo responsable de la motilidad, fueron sobreexpresados en ausencia de PM, en el tiempo dos horas, lo que consiste con los análisis de clasificación por COG, donde la categoría funcional mayormente sobrerrepresentada en ausencia de PM, dos horas post-inoculación fue Motilidad celular, en tanto que ciertos genes involucrados en la quimiotaxis fueron sobreexpresados en la condición con PM en el tiempo dos horas, contrario a *E. coli* (Figura 18)(Lu *et al*, 2013).

8.6 Propuesta del mecanismo de degradación del PM y PNF

8.6.1 Reconocimiento, hidrólisis del PM y genes tempranos en la degradación del PNF

Durante el tiempo inicial, el GED con mayor cambio en su expresión fue Ga0125972_1044180, una proteína que presenta el dominio *GAF* descrito en histidina quinasa, el módulo sensorial característico de los sistemas de traducción de señales de dos componentes. Uno de los mecanismos mayormente utilizados por las bacterias para el reconocimiento de señales

provenientes del ambiente, origina un estímulo acoplado a una respuesta adaptativa, la cual medía cambios en el comportamiento celular o en procesos biológicos. En el modelo general, la percepción de la señal por la proteína sensorial, ya sea que se encuentre unida a la membrana o en el citoplasma, promueve la autofosforilación de un residuo de histidina conservado, usualmente situado en el extremo carboxilo terminal. Posteriormente el fosfato, es trasferido a un residuo conservado de aspartato, usualmente situado en el extremo amino terminal del regulador de la respuesta. El regulador, ahora fosforilado, subsecuentemente inicia la respuesta biológica (Lau et al., 1997; Podgornai et al., 2013).

En el año de 1997 Lau y colaboradores identificaron dos genes involucrados en la degradación del Tolueno por *Pseudomonas putida* F1, *todS*, *todT*, una *histidina quinasa* y su respectivo regulador de la respuesta, los cuales integran un sistema de dos componentes. Sin embargo, no se logró discernir si el tolueno era la señal ambiental primaria o el estrés oxidativo en el entorno celular. Asimismo, debido a que se demostró que era una proteína citoplasmática y no transmembranal se propuso que la interacción del *histidina quinase* con una proteína de membrana u otras proteínas periplasmáticas podría ser necesaria; por lo que mencionan que *todX*, el primer gen del operón de degradación, una proteína de membrana, posiblemente está vinculada de alguna manera al proceso de transducción de la señal. Más recientemente, el proteoma junto con el análisis de ciertos genes por medio de RT-PCR de *Fischerella* sp. en presencia de PM fue reportado por Tiwari y colaboradores, en el 2018. En dicho análisis se propone un posible mecanismo de tolerancia y degradación de PM por parte *Fischerella* sp. donde, de manera similar a *Pseudomonas putida* F1, se menciona que un sistema regulatorio de dos componentes transmite la señal a una proteína hipotética, ya sea de manera directa o indirecta, la cual posiblemente funge como factor transcripcional, por lo que se sugiere que pudiera estar involucrada en la inducción de diferentes proteínas de respuesta a estrés, así como en la inducción de otra proteína hipotética, una probable hidrolasa que, debido a análisis bioinformáticos, se especula que está involucrada en el reconocimiento y metabolismo del PM (Tiwari et al., 2018).

El gen Ga0125972_1044180 no presenta sitios transmembranales, según los datos obtenidos por la base de datos de IMG/IM, motivo por el cual se podría especular que, al igual que en *Pseudomonas putida* F1, el sistema de dos componentes interactúa con una proteína de membrana, como la metilparatión hidrolasa (*mpd*). No obstante, durante el tiempo inicial no se observó la expresión diferencial de la enzima responsable de la hidrólisis del PM, la *mpd*, enzima altamente similar a las β -lactamasas. *B. cenocepacia* CEIB S5-2 posee diez β -lactamasas totales, de las cuales sólo una presentó cambios significativos para el tiempo dos horas, con un valor de veces de cambio de 2.99, disminuyendo su expresión a las cinco horas hasta 1.6, sin embargo su expresión en el tiempo inicial no demostró ser significativamente diferencial (Figura 21).

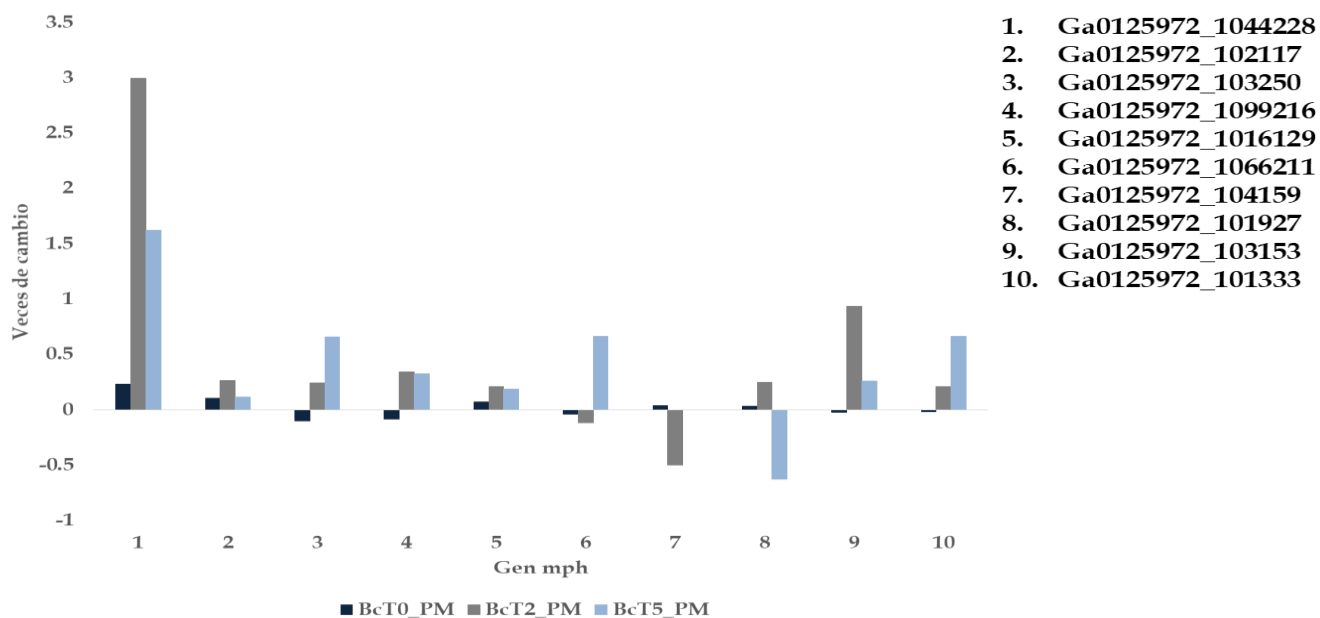


Figura 21. Expresión diferencial de los diez genes que codifican para β -lactamasas en el tiempo cero horas, dos horas y cinco horas.

Por otro lado, de modo semejante a *Fischerella* sp. otro de los genes tempranos en presencia de PM corresponde a un regulador transcripcional. El gen Ga0125972_1044179, identificado como un regulador transcripcional de la familia TetR, un sistema de transducción de señales de un sólo componente, común en bacterias expuestas a alteraciones en la composición de sus fuentes

de carbono. Estos reguladores han sido implicados en la regulación transcripcional de resistencia a múltiples fármacos, producción de antibióticos, patogenicidad, *quorum sensing*, estrés osmótico y formación de biofilms (Minh *et al.*, 2015). De igual manera se ha demostrado que los reguladores transcripcionales de la familia TetR regulan la expresión génica como respuesta a estímulos ambientales.

De acuerdo a diferentes reportes, se advierte la existencia de reguladores transcripcionales involucrados en la degradación del PNF o en sus productos de degradación. En el 2008 Takeo y colaboradores identificaron un regulador transcripcional tipo AraC (NphR) que regulaba la oxidación del PNF en *Rhodococcus sp.* PN1, posteriormente en el 2010 Shen y colaboradores reconocen un regulador transcripcional tipo Lys-R (LTTR) responsable de la degradación de HQ en *P. putida* DLL-E4, cuya mutación tenía como consecuencia la completa inhabilidad de degradar el HQ. Posteriormente en el 2015 Zhang y colaboradores describen la función del gen *pnpR* en *Pseudomonas sp.* cepa WBC-3, un LTTR implicado en la regulación de los operones involucrados en la degradación del PNF y, más tarde, en 2017 demostraron la regulación de uno de los operones, involucrado en la mineralización de HQ, por parte de un LTTR adicional denominado PnpM, el cual presentaba una identidad del 44% con PnpR. Mas recientemente en el 2018 Gu y colaboradores mencionan que probablemente reguladores de la familia TetR actúan como represores en presencia de fenol en *Rhodococcus sp.* CS-1. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado la participación de reguladores transcripcionales de la familia TetR en la degradación del PM ni del PNF.

Dos de los genes inducidos en el tiempo inicial, Ga0125972_104229 y Ga0125972_104231, correspondían a permeasas y transportadores respectivamente, pertenecientes a la superfamilia de facilitadores principales (MFS). Los transportadores son proteínas de membrana indispensables para las células, que toman los nutrientes del ambiente o exportan sustancias metabólicas y materiales tóxicos a través de la membrana celular. Los transportadores de la familia MFS son, probablemente, los más preponderantes de los transportadores de fármacos en

bacterias. Estos transportan iones, azúcares, fosfatos de azúcares, fármacos y otros solutos hidrofóbicos (Jianga *et al.*, 2013; Zomot *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2003).

Las secuencias de aminoácidos de Ga0125972_104229 y Ga0125972_104231 fueron sometidas a Blastp, método por el cual se observó que presentaron una identidad del 99.8% y del 91.39% del gen Ga0125972_104229 con un transportador de la familia MFS de *Burkholderia* sp. SJ98 y con *Burkholderia* sp. YI23, respectivamente, y el gen Ga0125972_104231 presentó una identidad del 99.45% y del 95.03% con un transportador de la familia MFS de *Burkholderia* sp. SJ98 y con *Burkholderia* sp. YI23, respectivamente. Ambas cepas fueron aisladas de muestras ambientales y demostraron ser capaces de biodegradar PNF y fenitrotión, motivo por el cual se propone que estos dos transportadores están involucrados en el traslado de productos de degradación del PNF hacia el medio extracelular (Lim *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012).

Finalmente, el análisis de la secuencia de aminoácidos del gen Ga0125972_104217 demostró una identidad del 100% sobre la secuencia de aminoácidos de *p-nitrofenol 4-monooxigenasa* de la familia Burkholderiaceae, con una cobertura del 100%, enzima que corresponde al gen *pnpA*, una monooxigenasa dependiente de FAD implicada en la degradación del PNF por la vía de la hidroquinona, que cataliza la hidroxilación del PNF a *p*-benzoquinona y la liberación de nitrato al medio (Figura 5), mientras que las proteínas hipotéticas, Ga0125972_104220 y Ga0125972_104221, utilizando la base de datos de NCBI, presentaron una identidad del 73% sobre la secuencia de aminoácidos de la *hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa* de *Burkholderia* sp. GAS332, con una cobertura del 98% y una identidad del 84% sobre la *hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa* de *Caballeronia humi* con una cobertura del 99%, respectivamente. Por otro lado, utilizando la base de datos de SIWSSPROT (Bienert *et al.*, (2017), se obtuvo que Ga0125972_104220 presentaba una identidad del 65.58% con la subunidad pequeña de la *hidroquinona 1, 2- dioxigenasa* y Ga0125972_104221 una identidad del 76.47% con la subunidad grande. La *hidroquinona 1,2-dioxigenasa*, es enzima clave en la vía de la hidroquinona, cataliza la ruptura del anillo aromático, pasando de hidroquinona a γ - semialdehído hidroximucónico (Figura 5) (Liu *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016).

Si bien el reconocimiento del PM por *B. cenocepacia* CEIB S5-2 no se conoce con certeza, de acuerdo a los datos obtenidos para el tiempo inicial y de reportes recientes se sugiere que, se sospecha que la *histidina quinasa* censa la señal ambiental primaria, este estímulo posiblemente actúa, ya sea directa o indirectamente, sobre el regulador transcripcional TetR el cual podría estar involucrado en la regulación positiva de los genes involucrados en la degradación del PNF, debido a que tres de los DEG's del tiempo inicial pertenecen a los genes de degradación, siendo el *pnpA* el que mostró una mayor expresión. Asimismo debido a que la permeasa y el transportador MFS se encuentran cerca del cluster de *pnp*'s, se especula que estos podrían estar involucrados en el transporte de productos de la degradación.

8.6.2 Degradación del PNF

Dos horas de exposición al PM y a PNF provocó la expresión diferencial de 166 genes, de los cuales 25 fueron únicos para el tiempo dos. Con la finalidad de discernir la probable condición fisiológica específica del tiempo de exposición, se analizó la posible función de los genes únicos. Dentro de los cuales se observó la expresión de tres reguladores transcripcionales, dos reguladores pertenecientes a la familia TetR, Ga0125972_1022413 y Ga0125972_10282 con un valor de veces de cambio de 3.48 y de 2.92 cada uno, y un regulador transcripcional de dos componentes de la familia LuxR, Ga0125972_1044186, con un valor de veces de cambio de 1.71, entre otros genes.

Como se había mencionado anteriormente, los reguladores transcripcionales de la familia TetR regulan la expresión génica como respuesta a estímulos ambientales, también se ha reportado su papel en la regulación de la síntesis de pirimidinas, degradación de purinas y en la homeostasis del pH. Además Alguel y colaboradores en el 2007 y Gu y colaboradores en el 2008 reportaron que *ttgr* y *acr*, miembros de la familia TetR, pueden unirse a compuestos tóxicos similares, los cuales son exportados por proteínas de membrana, cuya expresión está directamente vinculada, justamente, con los propios reguladores. Estos reguladores, por lo

tanto, facilitan la inducción de genes que codifican para bombas de eflujo en respuesta a la presencia de compuestos tóxicos.

Acorde a los reportes encontrados, Chen y colaboradores en el 2016 reportaron cambios de pH en el medio de cultivo de *Pseudomonas putida* DLL-E4 en presencia de PNF, cuya concentración más alta en *B. cenocepacia* CEIB S5-2 fue observada a las dos horas de exposición. Por otro lado, durante la misma condición también se observó la expresión de cuatro proteínas de membrana, una permeasa, Ga0125972_103847, la subunidad MFP de un transportador de la familia RND, Ga0125972_10733, una proteína de membrana no caracterizada, Ga0125972_10735 y una porina, Ga0125972_103850. Sólo para Ga0125972_10733 se encontraron reportes de transporte de moléculas farmacológicas (Pimenta *et al.*, 2005). Debido a esto, se cree que los reguladores Ga0125972_1022413 y Ga0125972_10282 posiblemente estén involucrados en la tolerancia y manejo del PNF ya sea, expulsando productos de la degradación tóxicos para la propia célula o lidiando con las alteraciones del pH en el medio extracelular.

El siguiente GED, el gen Ga0125972_1044183 fue identificado como un proteína de estrés universal (Usp), una proteína citoplasmática cuya expresión se ha visto alterada, provocado por diversas condiciones de estrés, ya sea internas o externas, involucradas en el arresto celular. En el 2001 se demostró en *E. coli* que la ausencia de esta proteína afectaba significativamente la tasa de supervivencia en presencia prolongada a diferentes agentes estresantes o a exposición a daño de DNA por diferentes agentes. La expresión diferencial y su expresión única a las dos horas de exposición indica un claro estado de estrés de *B. cenocepacia* CEIB S5-2. Adicionalmente, se observó la expresión diferencial de RNA polimerasa sigma-70 factor, subfamilia ECF con el identificador Ga0125972_1044184. Los factores sigma (δ) pertenecientes a la familia ECF (función extracitoplasmática) regulan genes en respuesta a factores estresantes que amenazan la integridad de la envoltura celular incluyendo la pared celular y la membrana. Estos a su vez son regulados por factores anti-sigma, los cuales impiden la unión a RNA, dicho factor anti-sigma es una proteína embebida en la membrana compuesta por un dominio externo y un dominio interno, éste dominio interno está unido al factor sigma evitando que se una al RNA polimerasa.

Por otro lado, el dominio extracelular reconoce una señal ambiental y transmite la señal al dominio interno, lo que provoca que se libere el factor sigma. La expresión de los genes mencionados refleja posibles procesos indispensables para *B. cenocepacia* CEIB S5-2 durante la exposición a PNF, para lidiar con el ambiente hostil del medio celular.

Posteriormente el gen Ga0125972_104623 anotado como una proteína redox putativa se expresó con un valor de veces de cambio de 2.37. Este presentó una identidad del 97% con una cobertura del 100% sobre la secuencia de aminoácidos de una α/β vuelta hidrolasa (alfa/beta hidrolasa) de *Burkholderia* sp. SJ98. La cual es común en enzimas hidrolíticas de origen filogenético y función catalítica diferentes, y presentan un trio catalítico muy conservado. Existen diferentes esterasas miembros de la superfamilia α/β hidrolasa. Estas enzimas son importantes debido a sus usos, ya sea en la industria de la comida, agricultura así como en la biodegradación. Khajamohiddin y colaboradores en el 2006 reportaron una hidrolasa perteneciente a la familia α/β hidrolasa, denominada *meta-fission product* (MFP) involucrada en la degradación de compuestos monoaromáticos, codificada dentro del cluster de genes involucrados en la degradación de organofosforados del plásmido pPDL2 de *Flavobacterium* sp. ATCC27551. Posteriormente, en 2015 Chakka y colaboradores evaluaron la actividad de dicha esterasa sobre PNF de manera *in vitro* y expresada en células de *E. coli* MG1655 (pSDP10), demostrando que sólo expresada en *E. coli* presentaba actividad sobre el PNF. Sin embargo, a pesar de que el mecanismo aún no es completamente comprendido, ellos proponen una inducción positiva de los genes *hcaR* y *mhpR* influenciada por la presencia de propionato, estos genes contribuyen a la regulación de los operones *hca* (operon fenilpropionato) y *mhp* (hidroxifenilpropionato), involucrados en la asimilación de compuestos aromáticos, dichos operones demostraron ser indispensable en la degradación del PNF.

Además del gen anteriormente mencionado, también se observó la expresión de genes cuyas posibles funciones podrían estar vinculados a vías alternas de degradación o mineralización del PNF y sus productos de degradación e incluso sobre el propio PM, como son los genes Ga0125972_1099206, Ga0125972_101762 y Ga0125972_1044174. El gen Ga0125972_1099206,

anotado como nitroreductasa, flavoenzimas dependientes de NAD(P)H- que catalizan la reducción de grupos nitro de una vasta variedad de compuestos aromáticos. Estas flavoenzimas pueden ser divididas en dos grupos, tipo I son, que insensibles al oxígeno y catalizan una reducción de dos electrones de los grupos nitro, teniendo como producto nitroso, el cual es reducido a hidroxilamina y subsecuentemente a aminos derivados, bajo condiciones aeróbicas y el Tipo II, que son sensibles a oxígeno y producen un radical anión nitro, que reacciona con el oxígeno para formar superóxido. Yang y colaboradores en el 2007 demostraron la actividad de una nitroreductasa sobre PM y paratión transformándolos a sus derivados aminos, amino-metil paratión y amino-paratión respectivamente, reduciendo su grupo nitro, sin embargo no observaron dicha actividad sobre el PNF de *Bacillus* sp. DM-1.

Posteriormente la secuencia de aminoácidos de Ga0125972_1044174 presentó un 100% de cobertura con un 99% de identidad sobre la secuencia de aminoácidos de *carboxi muconolactona decarboxilasa* de *Burkholderia cepacia*. Esta enzima cataliza la descarboxilación de γ -carboxymuconolactona a β -keto adipato enol-lactona a través de la vía del β -keto adipato por la rama del protocatecol vía esencial para la biodegradación de compuestos aromáticos tóxicos. Mientras que el gen Ga0125972_101762 presentó un 99% de cobertura con un 99% de identidad sobre la secuencia de aminoácidos de la familia de proteínas de *dienolactona hidrolasa* (DLH). La DLH es una proteína monomérica inicialmente identificada en *Pseudomonas knackmussi*, esta proteína forma parte de la rama del halocatecol de la vía del β -keto adipato y cataliza la hidrólisis del ester cíclico, dienolactona (4-carboximetileno-but-2-ene4-olido) a maleilacetato. Curiosamente la formación de dienolactonas es producto de la *cloromuconato cicloisomerasa*; en el caso de su contra-parte el enol-lactona, es generado por dos pasos enzimáticos catalizados por la *muconato cicloisomerasa* y la *muconolactona isomerasa*, y a pesar de la similitud en la estructura del enol-lactona y dienolactonas (4-carboximetileno-but-2-ene4-olido), la *enol-lactona hidrolasa* no ha demostrado actividad enzimática sobre los dienolactonas y viceversa. No obstante ambas vías convergen en la formación de β -keto adipato, el cual posteriormente, debido a la actividad de la CoA-transferasa y una tiolasa, entra al TCA en forma de succinil-CoA y acetil-CoA (Figura 22). La transferencia del coenzima A podría estar catalizado por el gen Ga0125972_1022136

anotado como acetil transferasa de la familia GNAT (relacionada con la N-acetil transferasa GCN5). Los integrantes de dicha familia catalizan la transferencia del grupo acetil de la coenzima A a un aceptor. La superfamilia GNAT presenta una amplia variedad de funciones, la gran diversidad de sustratos aceptores que son capaces de ser acetilados, deben interactuar con los diferentes miembros de GNAT y ser reconocidos.

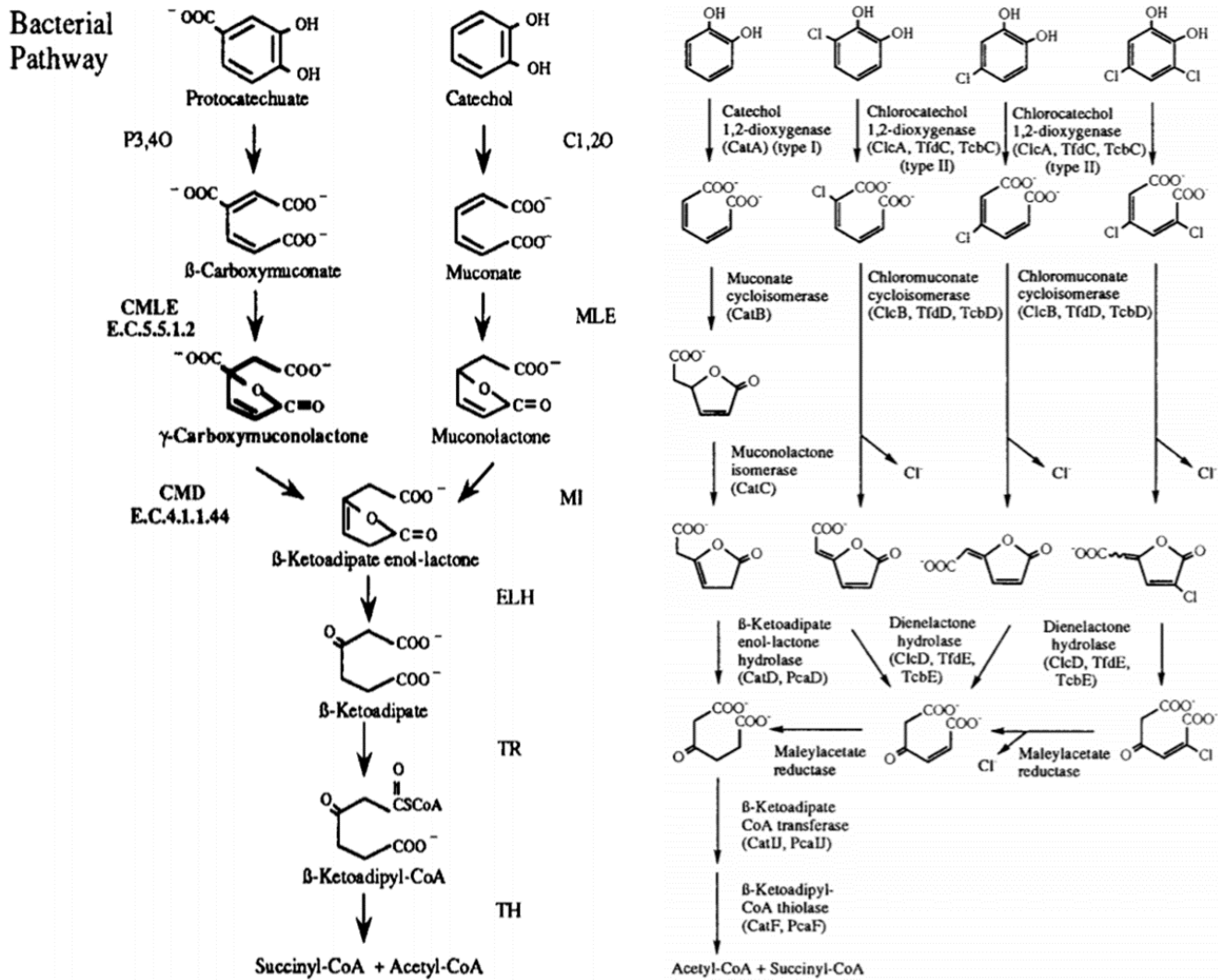


Figura 22. Vía del β-ketoadipato y sus modificaciones (Modificado de Harwoog et al., 1996).

Además de los genes antes mencionados, también se observó la sobreexpresión de genes como: Ga0125972_104645, HNH endonucleasa. Los dominios HNH están presentes en varias enzimas de restricción y en endonucleasas homing, así como en las proteínas Cas9; el gen Ga0125972_1001756, una asparagina sintasa, la cual cataliza la síntesis de L-asparagina a L-ácido aspártico en una reacción dependiente de ATP; una proteína con dominio Cupin (Ga0125972_1044173), esta superfamilia representa una gran diversidad de funciones biológicas de las cuales, en bacterias se reporta la actividad de isomerasa y epimerasas involucradas en la modificación de los carbohidratos de la pared celular en las bacterias y Ga0125972_103848 una (R,R)-butanediol dehidrogenasa/meso-butanediol dehidrogenasa/diacetil reductasa, dicha proteína cataliza la conversión de 2,3-butanediol a acetoina. García-Quintáns y colaboradores en el 2008 reportaron una sobreexpresión de dicho gen en condiciones ácidas en la cepa *Lactococcus* *bv. Diacetylactis* (Czapinska *et al.*, 2018; Dunwell, 1998; Larsen *et al.*, 1999).

Por último, la expresión diferencial del gen Ga0125972_1044228 presentó un valor de veces de cambio de 2.99 en el tiempo dos horas. Debido a estos resultados obtenidos se propone que el gen Ga0125972_1044228 podría estar involucrada en la hidrólisis de PM, por lo que se deberán realizar experimentos futuros para demostrar cual es el gen o los genes responsables de la hidrólisis del PM. Posteriormente, los genes *pnpA*, *PNFE_1* y *PNFE_2* aumentaron la expresión diferencial hasta alcanzar un valor de veces de cambio de 9.2 9.1 y 9.3 respectivamente. Asimismo para el tiempo dos horas, todos los genes involucrados en la vía de degradación del PNF de la HQ, comúnmente reportada para las bacterias Gram⁻, presentaron un valor de cambio significativo, mencionados enseguida de forma descendente: *pnpE_2*, 9.78; *pnpA*, 9.63; *pnpB* (*p-benzoquinona reductasa*), 9.60; *pnpE_1* 9.39; *pnpF* (*4-Hidroximuconico semialdehído deshidrogenasa*), 9.12 y *pnpD* (*maleiacetato reductasa*) 8.72. Por otro lado, el gen *pnpC* (*catecol 1,2-dioxigenasa*) cataliza la ruptura del hidroxiquinol (BT) obteniendo como producto maleilacetato, reportado para la vía del BT normalmente reportado para Gram⁺, presentó un valor de veces de cambio de 8.1, demostrando que *B. cenocepacia* CEIB S5-2 es capaz de utilizar genes reportados para ambas vías. Interesantemente, durante el tiempo dos horas, uno de los GED's únicos fue DLH, el cual cataliza la producción de maleilacetato a partir de diene lactona. Por lo tanto, se especula que la

degradación del PNF no es exclusiva de las vías del HQ y BT, sino que además, probablemente sus productos de mineralización son susceptibles a actividades enzimáticas ajenas a estas dos vías. Ya que, es bien sabido que los microorganismos utilizan diferentes sustratos, después son transformados a intermediarios centrales, eliminando la característica aromática de la molécula. Dicho proceso sucede gracias a que las vías superiores convergen para posteriormente catalizar la transformación de intermediarios a metabolitos centrales como el acetyl CoA, succinyl CoA y piruvato (Fuchs *et al.*, 2011) (Figura 23). Finalmente los genes *pnpA'* y el gen Ga0125972_104225, identificado como una subunidad de la *ferredoxina de nitrato reductasa* o *dioxigenasa*, presentaron un valor de veces de cambio de 10.20 y 8.39 respectivamente. El gen Ga0125972_104225 presentó una identidad de 67% con una cobertura del 88% sobre la secuencia de aminoácidos de proteínas Rieske (2Fe-2S) de *Paraburkholderia ginsengiterrae*. Para este tipo de proteínas, se han reportado dos clases, la primera, proteínas de membrana, que sirven como componentes de complejos respiratorios o fotosintéticos. La segunda incluye ferredoxinas solubles asociadas a sistemas, que catalizan pasos claves en la degradación aeróbica de compuestos aromáticos. Debido a las características mencionadas, se propone que dicho gen está involucrado en la degradación del PNF por la vía BT. Por su parte el gen *pnpA'* presentó una identidad del 99% con una cobertura del 100% sobre la *p-nitrofenol 4-monooxigenasa* de *Burkholderia* sp. SJ98, involucrada en la degradación del PNF por la vía HQ.

B. cenocepacia CEIB S5-2 presenta todos los genes involucrados en la vía de degradación del PNF reportada para las bacterias Gram⁻, no obstante *pnpC* codifica para la enzima involucrada en la degradación del Benzenotriol, metabolito de la degradación del PNF por medio de esta vía reportada para las bacterias Gram⁺, a maleiacetato. Sin embargo a pesar de que una de las enzimas involucrada en la vía del benzenotriol esté siendo inducida por el PNF, no se han encontrado las demás enzimas involucradas, al igual que en otros reportes mencionados anteriormente. Adicionalmente al estar en presencia de PM, *B. cenocepacia* CEIB S5-2 también expresó *pnpA'* de manera diferencial, que al igual que el gen *pnpA*, codifica para el mismo producto. La presencia de genes que codifican para la misma enzima se ha reportado en *P. putida* DLL-E4, sin embargo los genes *pnpA* y *pnpAb*, que codifican para la misma enzima, se

expresaron de manera diferente, siendo *pnpA* el gen indispensable en la degradación del PNF, debido a que su producto (HQ) funge como activador de todo el operón de genes involucrados en la degradación de PNF, contrario a *pnpAb* el cual no presentó actividad sobre el PNF. Chen y colaboradores en el 2016 demostraron una cascada compleja de regulación sobre el proceso de degradación del PNF, mostrando que el primer efector del gen *pnpA* era directamente el PNF, mientras que el producto de la oxidación del PNF (HQ) proceso catalizado por *pnpA*, es el efector de todo el operón de genes.

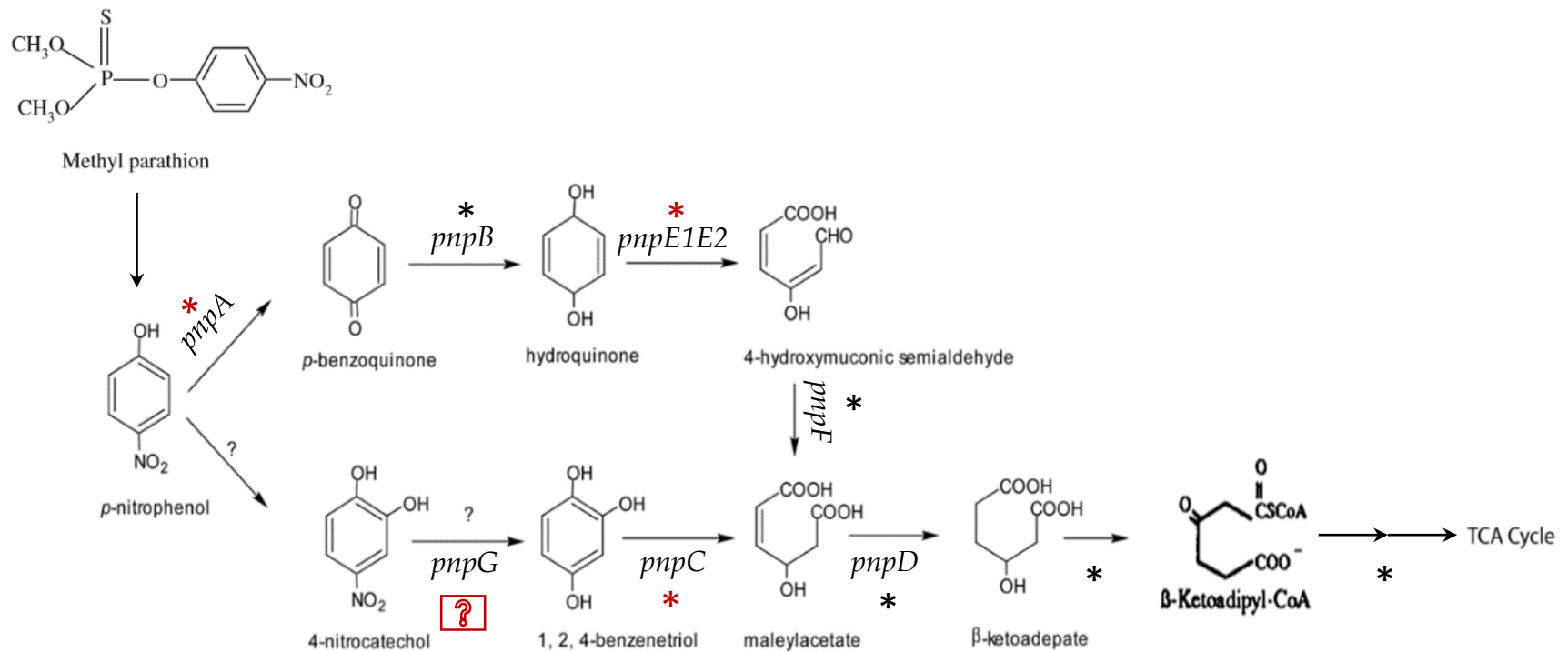


Figura 23. Ubicación de los genes *pnp*'s en la vía de degradación del PNP (Modificada de Popoca-Ursino *et al.*, 2017). Los asteriscos rojos señalan la ubicación de los genes expresados diferencialmente desde el tiempo inicial, mientras que los asteriscos negros señalan los genes *pnp*'s que demuestran una expresión significativamente diferencial a partir del tiempo dos horas. El gen Ga0125972_104225 está indicado con un signo de interrogación y se designó como *pnpG*.

8.6.3 Perfil transcripcional de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 posterior a la hidrólisis de PM y mineralización del PNF

Tres horas después, a las cinco horas de exposición, el perfil transcripcional de *B. cenocepacia* CEIB S5-2, a diferencia de las dos horas de exposición donde se observó la expresión de genes en su mayoría involucrados en el metabolismo en diversos ambientes, se notó una sobreexpresión de vías metabólicas como el metabolismo del azufre, biosíntesis de aminoácidos, fosforilación oxidativa entre otros. De igual manera durante el tiempo cinco horas, no se observó la expresión de reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia TetR, por lo que se propone que la expresión de los reguladores transcripcionales pertenecientes a esta familia en *B. cenocepacia* CEIB S5-2, juegan un papel principal en la degradación de PM y PNF. El regulador transcripcional que se observó a las cinco horas fue Ga0125972_103281, el cual codifica para un regulador transcripcional de la familia LysR, que actúan, ya sea como activadores o represores. Se ha reportado su acción sobre genes cuyos productos están involucrados en metabolismo, división celular, *quorum sensing*, virulencia, motilidad, fijación de nitrógeno, producción de toxinas, respuesta a estrés oxidativo entre otros (Maddocks *et al.*, 2008). Además, este gen presentó el mayor valor de veces de cambio. Asimismo, se mostró el gen Ga0125972_1033174, regulador transcripcional de la familia GntR, involucrado en diferentes procesos biológicos como producción de antibióticos, reconocimiento del estatus nutricional, crecimiento, proliferación, entre otros. Generalmente presentan un dominio de unión a DNA HTH (hélice vuelta hélice) en el extremo amino terminal, mientras que en el extremo carboxilo terminal presenta un dominio de oligomerización y sitio de unión a ligando, el cual reconoce específicamente diversas moléculas efectoras. La unión del ligando específico altera la afinidad del dominio de unión a DNA por el DNA Y finalmente los genes Ga0125972_104458 y Ga0125972_103280 que corresponden a los reguladores transcripcionales de la familia ArsR y AraC respectivamente. Los miembros de la familia ArsR solo se han reportado como represores transcripcionales, en este caso los operones son reprimidos cuando el regulador se une específicamente a una secuencia promotora de DNA, dicha unión es inhibida por la unión de un metal al regulador y, finalmente los reguladores transcripcionales de la familia AraC típicamente activan la expresión

de genes involucrados en el metabolismo del carbono, respuesta a estrés o virulencia (Fillenberg *et al.*, 2015; Resch *et al.*, 2010).

De manera análoga, en el tiempo cinco horas se observó la expresión única de diferentes transportadores pertenecientes a la familia MFS. Por otra parte, también se observó la expresión de genes que formaban parte de un sistema de eflujo, tales como Ga0125972_10871, Ga0125972_10872 y Ga0125972_10873. El análisis de las secuencias de aminoácidos de dichas secuencias demostró que Ga0125972_10871 codifica para una subunidad de transportador de membrana externa (Outer membrane protein (*oprM*)), Ga0125972_10872 para la subunidad permeasa de un transportador de eflujo RND (*resistencia nodulación y división celular*), mientras que Ga0125972_10873 para la subunidad adaptadora de un transportador periplasmático RND.

Entre los sistemas de eflujo RND se encuentra el sistema MexAB-OprM, el cual juega un papel importante en la multi resistencia a fármacos. El sistema de flujo se compone por un ducto anclado a la membrana externa (OprM), el cual permite la difusión de solutos pequeños, un transportador integral de la membrana interna (MexB). Esta subunidad selecciona los sustratos y los exporta a través de la membrana citoplasmática y MexA, una lipoproteína anclada a la membrana interna expuesta al sitio periplasmático y se asume que interacciona con las subunidades MexA y OprM. Estas proteínas forman un canal que atraviesa la membrana externa e interna y permite la exclusión de fármacos directamente al medio extracelular. (Akama *et al.*, 2004; Symmons *et al.*, 2009; Phan *et al.*, 2010)

Otros de los DEG's expresados a las cinco horas fueron los genes Ga0125972_101442, *alquil hidroperoxido reductasa* subunidad D (AhpD), y Ga0125972_101443, *peroxiredoxin* (*alquil hidroperoxido reductasa* subunidad C). Dichos genes protegen a las células del daño causado por estrés oxidativo ya que catalizan la reducción de peróxidos a sus correspondientes alcoholes (Bryk *et al.*, 2002; Nunn *et al.*, 2002). Hasta el momento no se ha reportado la expresión diferencial de dichos genes en otras bacterias capaces de degradar el PM; sin embargo, si se ha reportado que la exposición a dicho compuesto provoca estrés oxidativo como es el ejemplo de

Fischerella sp., donde se reportó la presencia de especies reactivas de oxígeno después de dos y ocho días de exposición a PM (Tiwari et al., 2017), por lo que es probable que la función de dichos genes, sea justamente proteger a la célula del estrés oxidativo al cual esta siendo expuesta. De manera similar Chen y colaboradores en el 2016 reportaron la sobrerrepresentación de genes involucrados en la respuesta a estrés, Tiwari y colaboradores, como se mencionó anteriormente, reportan una conducta semejante en *Fischerella sp* al exponerla a PM. Adicionalmente se reportan cambios similares en *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas putida* F1 durante su crecimiento en presencia de compuestos aromáticos.

Asimismo se observó la sobreexpresión del gen Ga0125972_1001299, el cual codifica para la chaperonina GroEL, miembro de las chaperoninas, las cuales asisten a las proteínas para que alcancen su estado nativo, frecuentemente bajo condiciones en las que no sucede espontáneamente. Adicionalmente brindan protección de proteínas del desplegamiento y agregación. La sobrerrepresentación de dichos genes podría estar siendo inducida por el daño a las proteínas, al ADN, al RNA o a los lípidos, provocado por el estrés oxidativo. No obstante, además de que algunos agentes ambientales como la radiación UV o compuestos, en este caso en PM, generan el O₂- intracelular, se sabe que varios de los productos de la reducción de oxígeno molecular catalizada por enzimas de la cadena respiratoria, son especies reactivas de oxígeno. Durante el tiempo cinco horas se observa la sobreexpresión de los genes Ga0125972_1002114 y Ga0125972_1002115 anotados como cyoB y cyoC, los cuales demostraron una identidad del 100% sobre una cobertura del 99% contra la secuencia de aminoácidos de citocromo o ubiquinol oxidasa (Cyt *bo*₃) subunidad I y subunidad III de *B. cenocepacia* y *Burkholderia sp.* AU16741, respectivamente. El citocromo *bo*₃ o Cyt *bo*₃ es un miembro de la superfamilia de las oxidasas hemo-cobre, bombas de protones que acoplan la reducción de oxígeno molecular a agua, a la translocación de protones a través de la membrana. Cyt *bo*₃ cataliza la oxidación del ubiquinol -8 y la reducción del O₂ a agua; la energía libre de esta reacción se utiliza para bombear protones a través de la membrana. Esta enzima está formada por las subunidades CyoA, B, C y D (Cabiscol et al., 2000; Chepuri et al., 1990; Choi et al., 2017;

Mogui *et al.*, 1994). Por la que presencia de estrés oxidativo pudiera no ser influenciado únicamente por la presencia de metabolitos, producto de la degradación del PNF.

Adicionalmente, además de observar la expresión de genes involucrados en la fosforilación oxidativa, se demostró la expresión de genes involucrados en el metabolismo del azufre, así como en biosíntesis de aminoácidos. En la asimilación metabólica del azufre de sulfato inorgánico, el sulfato debe ser activado para así entrar al metabolismo celular. Dicha activación comienza con la catálisis de la adenilación del sulfato por medio de la ATPS (ATP sulfurilasa) para producir APS (5'- fosfosulfato). La ATPS se ha reportado que es un heterodimero conformado por las subunidades *cysD* y *cysN*, y se ha demostrado que son indispensables para la síntesis de aminoácidos azufrados o, alternativamente, APS puede ser fosforilada por APS quinasa para producir 3'-fosfoadenosina 5'- fosfosulfato (PAPS). El sulfonucleótido activado se reduce, posteriormente a sulfito y adenosin 5'-fosfato (AMP) por la PAPS reductasa (codificada por el gen *cysH*), el sulfito es reducido de nuevo a sulfuro, el cual es incorporado a un aceptor amino ácido para formar cisteína o homocisteína. Tres de éstas proteínas se expresaron diferencialmente, Ga0125972_1026138 corresponde a la subunidad *cysN*, Ga0125972_1026139 a la subunidad *cysD* del ATP sulfurilasa y finalmente *cysH* (Kopriva *et al.*, 2002; Mougous *et al.*, 2005; Savage *et al.*, 1997).

Ulteriormente, uno de los genes ubicados en biosíntesis de aminoácidos es el gen Ga0125972_1013138, que codifica para la subunidad pequeña de la glutamato sintasa, flavoproteína que cataliza la transferencia del grupo amino de la glutamina al C2 del 2-oxoglutarato (2-OG), produciendo dos moléculas de glutamato y forma parte esencial en la asimilación de amonía. NADPH-GltS está compuesta por dos subunidades α y β que contienen un flavin adenina dinucleótido (FAD), un flavin mononucleótido (FMN) y tres diferentes clusters hierro-azufre (Fe/S). La vía de glutamine sintetasa/ glutamate sintasa, está involucrada en el crecimiento bacteriano cuando hay poca disponibilidad de amonía, o en bacterias carentes de glutamate deshidrogenases o deshidrogenasas de aminoácidos equivalentes. Esta vía es de crucial importancia para las bacterias y células vegetales, ya que los productos L-glutamine y L-

glutamato son los donadores de nitrógeno para la biosíntesis de compuestos importantes nitrogenados como por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos entre otros (Cottevieille *et al.*, 2008; van den Heuvel *et al.*, 2004; Vanoni *et al.*, 1999). Y, curiosamente otros genes que mostraron una expresión diferencial fueron Ga0125972_1019119, *4-aminobutirato aminotransferasa apoenzima* y Ga0125972_1019118, *Succinato semialdehído dehidrogenasa* (SSADH). *4-aminobutirato aminotransferasa* es una de las enzimas involucradas en la degradación del 4-aminobutirato (GABA) tanto en procariotas y eucariotas. GABA es producido por la enzima *glutamato descarboxilasa* y su degradación se consigue a través de la enzima dependiente de piridoxal 5'-fosfato (PLP), *γ-aminobutirato aminotransferasa*. La enzima cataliza la degradación de GABA en presencia de α-ketoglutarato para producir semialdehído succínico (SSA) y ácido glutámico. Seguido el semialdehído succínico es convertido a ácido succínico (SA) por la enzima *semialdehído deshidrogenasa*. Finalmente dicho SA producido a partir de la degradación de GABA entra al TCA (Langendorf *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2004).

La presencia de genes involucrados en la fosforilación oxidativa, así como en la biosíntesis de aminoácidos y la generación de intermediarios del TCA, sugiere que la cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2, aún después de las cinco horas de exposición, presenta un posible crecimiento, no obstante en el presente trabajo no se pudo demostrar crecimiento bacteriano significativo, y las horas posteriores no fueron evaluadas durante la cinética. Por otro lado Popoca-Ursino (2012), evaluó el crecimiento de la cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2 con PM como única fuente de carbono y reportó que, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento en presencia y en ausencia de PM; sin embargo en la hora doce se comienzan a ver diferencias significativas en el crecimiento, siendo la condición en presencia de PM la que presentó crecimiento celular en comparación a las condiciones en ausencia de PM. Por lo que, de acuerdo con estos reportes y a los genes observados durante las cinco horas, se sugiere que el crecimiento de la cepa *B. cenocepacia* CEIB S5-2, si bien no es significativo durante el proceso de degradación, no cesa completamente por lo que se propone la utilización de PM como fuente de carbono

8.7. Validación de los datos por medio de RT-PCR

Los genes utilizados para la validación de los datos obtenidos por medio de RNA-seq fueron el gen *mph*, anteriormente propuesto por Fernandez-Lopez y colaboradores (*mph1*) y el gen que presentó mayor valor de cambio en el presente estudio, los genes involucrados en la degradación de PNF, *pnpA*, *pnpB*, *pnpA'*, *pnpE2*, *pnpE1*, *pnpF*, *pnpC* y *pnpD*, además del gen *fdx*, propuesto como *pnpG* y el gen Ga0125972_1044180, designado como GAF.

De forma similar los genes tempranos durante el tiempo inicial correspondieron a los genes *tetR*, la *histidina quinasa* y los genes *pnpA*, *pnpB*, *pnpE2* y *pnpE1*, siendo la *histidina quinasa* la que demostró un mayor valor de cambio. Durante el tiempo inicial, al igual que en lo obtenido por RNA-seq, no se obtuvieron valores significativos para el gen *mph1* ni para el gen *mph2* (Figura 24). Posteriormente en el tiempo dos horas la expresión del gen *mph2* demostró una expresión diferencial significativa en presencia de PM, sin embargo debido a que no se observaron cambios en ninguno de los genes desde el tiempo inicial, se necesitaran realizar experimentos posteriores para discernir si alguno de estos genes están involucrados en la hidrólisis del PM. En tanto que los genes involucrados en la degradación del PNF demostró, de igual manera estar inducido por la presencia del PNF, aunque durante el tiempo dos horas su valor de veces de cambio fue mayor relacionada a las cero horas, de igual manera que en el RNAseq, no fue hasta las dos horas de exposición a PM que se comenzó a observar la expresión diferencial de todos los genes involucrados en la degradación del PNF (Figura 25). Por último, durante las cinco horas, primeramente, los genes *mph* no presentaron expresión diferencial entre condiciones. Entre tanto, al igual que en los datos obtenidos por RNAseq se observó, incluso una expresión mayor de los genes *pnp's*, a pesar de que la mayor concentración de PNF se presentó a las dos horas de incubación. Debido a los datos obtenidos del tiempo, se especula que la regulación de los genes *pnp's* no sólo es inducida por el PNF y de sus metabolitos de degradación sino que, además, dichos reguladores podrían presentar una gran afinidad a dicho compuesto, motivo por el cual se explicaría que a pesar de que la concentración de PNF disminuyó significativamente, aún existe una gran sobrerrepresentación de los genes *pnp's* (Figura 26).

Por otro lado los datos obtenidos para GAF demostraron tener una mayor expresión en el tiempo inicial (T0) al igual que en los datos obtenidos por el RNA-seq, en comparación a los tiempos dos y cinco, lo que insinúa que GAF es un sistema indispensable para la identificación de PM en el medio por parte de *Buskholderia cenocepacia* CEIB S5-2. Dicho valor de cambio disminuye para los tiempos dos y cinco, aunque sigue siendo significativamente diferencial por lo que se cree es necesaria la investigación bioquímica y molecular de este gen para un mayor entendimiento del proceso de identificación del PM y proceso de degradación (Figura 27).

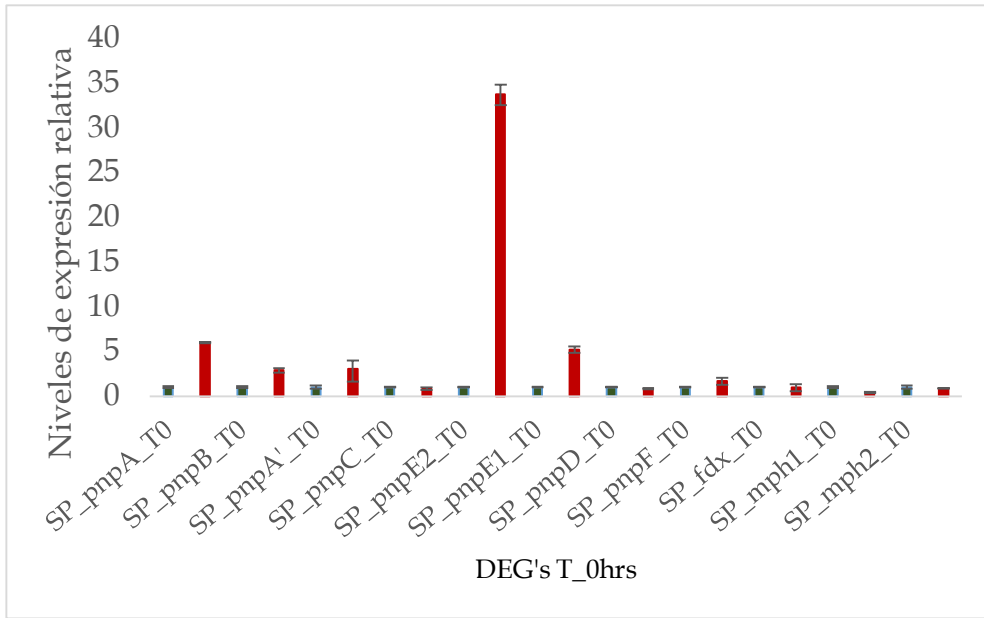


Figura 24. Expresión relativa de los genes implicados en la hidrólisis del PM y principio de degradación del PNF en el tiempo inicial

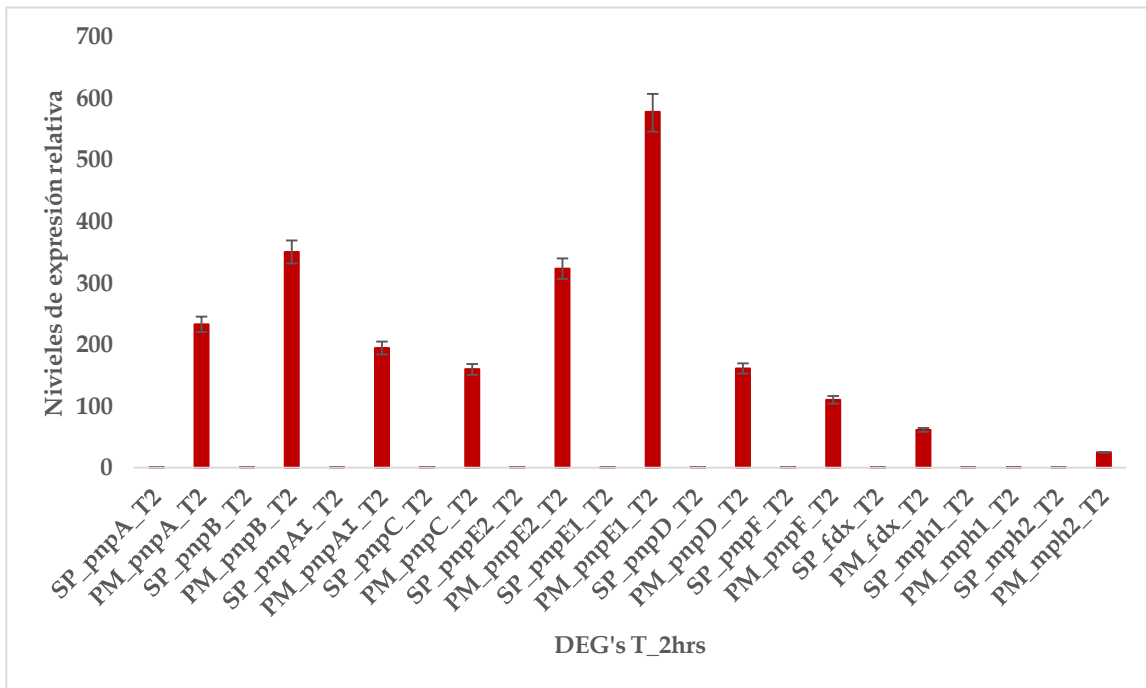


Figura 25. Expresión relativa de los genes implicados en la hidrólisis del PM y degradación del PNF en el tiempo dos horas.

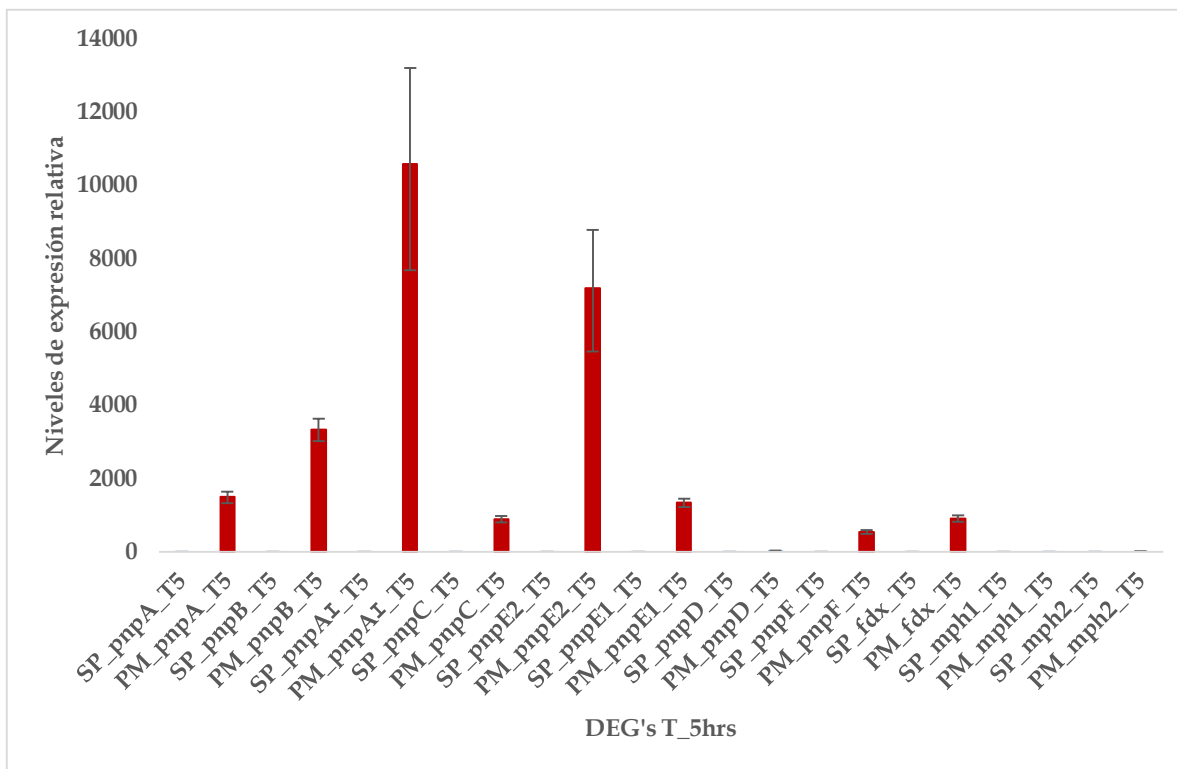


Figura 26. Expresión relativa de los genes implicados en la hidrólisis del PM y degradación del PNF en el tiempo cinco horas.

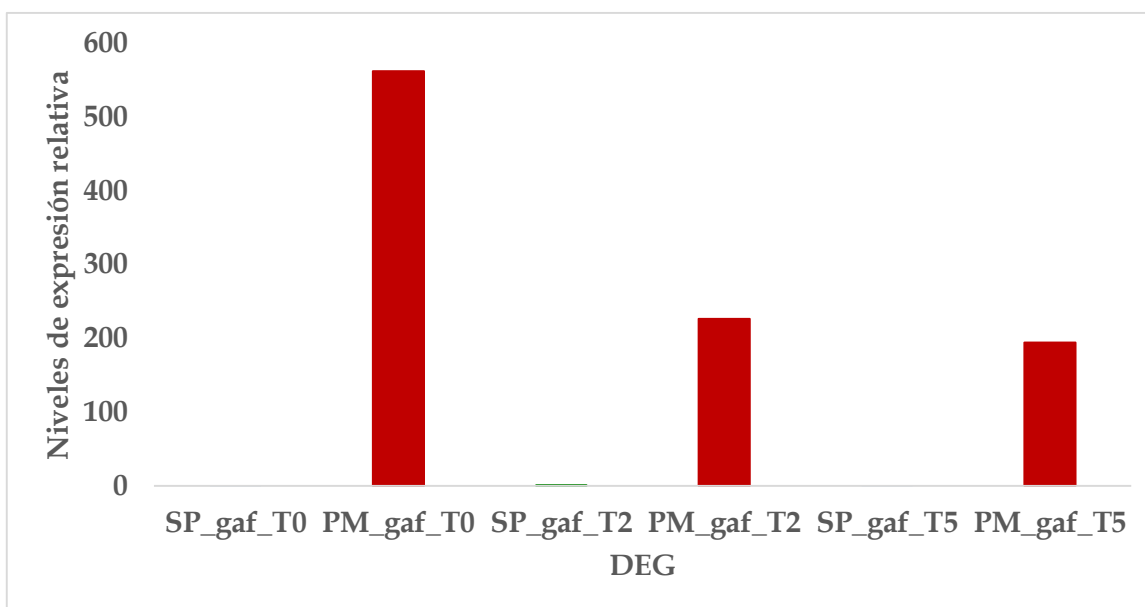


Figura 27. Expresión relativa del gen Ga0125972_1044180 (GAF) durante la exposición a PM y PNF en los tiempos cero, dos y cinco horas

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos del análisis del perfil transcripcional de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 en presencia de PM demuestran que, además de los cambios transcripcionales que demostraron los genes involucrados directamente en la hidrólisis del PM y degradación del PNF, el PM desencadena respuestas transcripcionales a genes ajenos a la misma degradación. Los genes pertenecientes a las categorías C, K y H fueron mayormente expresados en presencia de PM en los tres tiempos demostrando una sobrerregulación de genes involucrados en la producción de energía, en el metabolismo de coenzimas y finalmente, una sobre expresión en los genes involucrados en el proceso de transcripción. Entre tanto, en la condición control en el tiempo dos horas se observó una sobrerregulación de genes involucrados en la formación del flagelo, mientras que para la condición problema se observó una leve sobrerrepresentación de genes involucrados en quimiotaxis. Por otro lado la categoría G se vio sobrerrepresentada en el tiempo dos para la condición problema, mientras que para el tiempo cinco esta estuvo sobrerrepresentada en la condición control. De igual manera para el análisis de las vías metabólicas, donde ya demostró que diferente a otros reportes, las vías mayormente representadas no corresponden al TCA. No obstante como ya se ha reportado, las vías del glioxilato y la vía del propanoato si fueron sobrerrepresentadas. Los resultados obtenidos por medio del KEEG demuestran una relación entre procesos metabólicos cruciales y la presencia del PM

De manera general se puede observar que los cambios en la expresión de los genes de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 se relaciona con la habilidad de lidiar de una mejor manera con el ambiente en el que se encuentra. La presencia de PM en el medio parece inducir una respuesta transcripcional mayormente regulada ya que la expresión de reguladores transcripcionales es mayor en comparación a la condición control. Adicionalmente, la sobreexpresión de transportadores, permeasas y porinas en la condición problema, pudiera estar demostrando un mayor intercambio de moléculas con el medio de la rodea. Desde el tiempo inicial se observó la expresión de diferentes transportadores y permeasas demostrando que estos pudieran ser

indispensable para contender contra la posible toxicidad que el PM. El PNF y los metabolitos productos de su degradación, pudieran estar ejerciendo sobre la célula, ya que durante la exposición a estas moléculas, la expresión de estos genes aumentaba, además de que se expresaron más a lo largo del tiempo. Dicho esto, se podría suponer que los genes expresados en el tiempo inicial, son cruciales para la respuesta de la célula a la presencia del PM ya que su expresión fue significativa en los tres tiempos en presencia de PM, además de que estos genes no se comparten con ninguno de los tiempos en la condición problema. Posteriormente el análisis de la respuesta específica de *B. cenocepacia* CEIB S5-2 demostró en su mayoría la expresión diferencial de genes involucrados en degradación de compuestos xenobioticos, lo que demuestra que las cero y dos horas son cruciales para la mineralización del PNF. Adicionalmente el análisis de dicho perfil demostró que la cepa era capaz de degradar el PNF utilizando diferentes vías además de las vías de HQ y BT lo cual probablemente eficientiza el proceso de degradación. Hasta el momento no se han encontrado reportes que mencionen la utilización de diferentes vías para la degradación de PNF.

Mas tarde, a las cinco horas de exposición a PM y PNF, el perfil transcripcional pasó de estar meramente enfocado en la degradación de compuestos aromáticos, a presentar expresión diferencial de genes involucrados en procesos fisiológicos, como lo es el metabolismo de aminoácidos y la fosforilación oxidativa. Por otro lado se observaron genes únicos involucrados en la respuesta a estrés oxidativo. Sin embargo, para un mejor entendimiento del proceso se deberán analizar los genes que se comportan entre los tres tiempos en ausencia de PM.

10. PERSPECTIVAS

De acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo de investigación se propone, primeramente:

- Realizar una cinética de degradación y crecimiento, bajo las mismas condiciones de cultivo con la finalidad de:
 - Evaluar el crecimiento de *B. cenocepacia* CEIB S5-2
 - Evaluar los genes expresados en tiempos anteriores a las dos horas y posteriores a las cinco horas de exposición, debido a que la expresión de los genes *pnp's* aún no demuestra alguna disminución en la expresión.
- Evaluación de una mayor cantidad de genes por medio de RT-PCR
- Análisis de la actividad del *mph* propuesto aquí.
- Análisis de la nitroreductasa reportada en el tiempo dos horas para discernir su posible papel en la degradación del PM
- Realizar mutantes del regulador transcripcional *tetR* del tiempo inicial, *histidina quinasa*, *pnpA'*, *fdx*
- Analisar la posible disposición en operon de los genes *pnp's* e investigar si el PNF es el efector de todos los genes involucrados en su degradación
- Evaluar el papel de los transportadores Ga0125972_104229 y Ga0125972_104231 debido a que están situados adyacentes a los genes *pnp's*
- Evaluar la posible patogenicidad de la cepa

11. REFERENCIAS

- Abdolkarim P., Nasser J., Mohammad A. & Shahin S., (2002). Survival following severe aluminum phosphide poisoning. *J Pharm Pract Res*; (32): 297–299
- Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia S., Nikfar S., Rezaie A., (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit*, (6): 141-147.
- Akama H., Kanemaki M., Yoshimura M., Tsukihara T., Kashiwagi T., Yoneyama H., Narita S., Nakagawa A. & Nakae T., (2004). Crystal structure of the drug-discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: Dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *Journal of Biological Chemistry*, (51): 52816-52819.
- Akama H., Kanemaki M., Yoshimura M., Tsukihara T., Kashiwagi T., Yoneyama H., Narita S., Nakagawa A., & Nakae T., (2004). Crystal Structure of the Drug Discharge Outer Membrane Protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, (51): 52816–52819.
- Albendín G., (2009). Caracterización de las colinesterasas presentes en cerebro y músculo de Dorada (*Sparus aurata*) y estudio de su inhibición por insecticidas organofosforados. Universidad de Cádiz facultad de ciencias del mar y ambientales.
- Alguel Y., Meng C., Terán W., Krell T., Ramos J., Gallegos M-T. & Zhang X., (2007). Crystal Structures of multidrug Binding Protein TtgR in Complex with Antibiotics and Pnat Antimicrobials. *J. Mol. Biol.* (3):829–840.
- Asai K., (2018). Anti-sigma factor-mediated cell surface stress responses in *Bacillus subtilis*. *Genes Genet. Syst.* (92): 223–234.
- Badii, M. & Varela, S. (2008). Insecticidas Organofosforados: Efectos sobre la salud y el Ambiente. *CULCyT*, 5(28): 5-15.
- Bienert S., Waterhouse A., de Beer T., Tauriello G., Studer G., Bordoli L., & Schwede T., (2016). The SWISS-MODEL Repository – new features and functionality. *Nucleic acids research*, (D1), D313-D319.
- Cabiscol E., Tamarit J., Ros J., (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Internal Microbiol.*, (1):3-8.

- Campbell E., Tupy J., Gruber T., Wang S., Sharp M., Gross C. & Darst S., (2003). Crystal Structure of *Escherichia coli* E with the Cytoplasmic Domain of Its Anti-RseA. *Molecular Cell*, (4):1067–1078.
- Carlier A., Agnoli K., Pessi G., Suppiger A., Jenul C., Schmid N., Tümmler B., Pinto-Carbo M., Eberl L. (2014). Genome sequence of *Burkholderia cenocepacia* H111, a cystic fibrosis airway isolate. *Genome Announc*, 2(2):1-2
- Chakka D., Gudla R., Madikonda A., Pandeeti E., Parthasarathy S., Nandavaram A. & Siddavattam D., (2015). The Organophosphate Degradation (opd) Island-borne Esterase-induced Metabolic Diversion in *Escherichia coli* and Its Influence on *p*-Nitrophenol Degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(50): 29920–29930.
- Chapalamadugu S. & Chaudhry G., (1992). Microbiological and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphates. *Crit Rev Biotechnol*, 12(5/6): 357–389.
- Chaudhry G., Ali A. & Wheeler W., (1988). Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the opd gene from a *Flavobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol*, 54(2):288–293.
- Chen Q., Huang Y., Duan Y., Li Z., Cui Z. & Liu W., (2018). Crystal structure of p-nitrophenol 4-monooxygenase PnpA from *Pseudomonas putida* DLL-E4: The key enzyme involved in p-nitrophenol degradation. *Biochem Biophys Res Commun.*, (4):715-720.
- 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):1-18.
- Chepuri V., Lemieux L., Au D. & Gennis R., (1990). The Sequence of the cyo Operon Indicates Substantial Structural Similarities between the Cytochrome o Ubiquinol Oxidase of *Escherichia coli* and the aas-type Family of Cytochrome c Oxidases. *Journal of Biology Chemistry*, (19):11185-11192.
- Choi S., Lin M., Ouyang H., Gennis R., (2017). Searching for the low affinity ubiquinone binding site cytochrome *bo*₃ from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, (5):366-370.

- Cope W., Leidy R. & Hodgson E., (2004) Classes of toxicants: Use classes. A Textbook of modern Toxicology, edited by Ernest Hodgson, Third edition: 49-74.
- Cottevieille M., Larquet E., Jonic S., Petoukhov M., Caprini G., Paravisi S., Svergun D., Vanoni M. & Boisset N., (2008). The Subnanometer Resolution Structure of the Glutamate Synthase 1.2-MDa Hexamer by Cryoelectron Microscopy and Its Oligomerization Behavior in Solution FUNCTIONAL IMPLICATIONS. *Journal of Biological Chemistry*, (13): 8237-8249.
- Czapinska H., Kowalska M., Zagorskaite E., Manakova E., Slyvka A., Xu S., Siksnys V., Sasnauskas G. & Bochtler M., (2018). Activity and structure of EcoKMcrA. *Nucleic Acids Research.*, (18): 9829–9841
- Damalas, C.A. (2009). Understanding benefits and risks of pesticide use. *Scientific Research and Essay*. 4(10):945-949
- Dobritsa A. & Mansour S., (2016). Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (66):2836–2846.
- Dragun J., Kuffner A. & Schneider R., (1984). Groundwater contamination. 1. Transport and transformation of organic chemicals. *Chem Eng* (91): 65–70.
- Dunwell J. Cupins: A New Superfamily of Functionally Diverse Proteins that Include Germins and Plant Storage Proteins. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.*, (1): 1-32.
- Dyda F., Klein D. & Hickman A., (2000). GCN5-related N-Acetyltransferases: A Structural Overview. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* (4):81–103
- Ellenhorn M., Schonwald S., Ordog G., Wasserberger J., (1997). *Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*, Williams & Wilkins, Maryland, 1614–63.
- EPA (2004) <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets>.
- Errampalli D., Tresse O., Lee H., Trevors J., (1999). Bacterial survival and mineralization of p-nitrophenol in soil by green fluorescent protein-marked *Moraxella* sp. G21 encapsulated cells. *FEMS Microbiol Ecol*, (30):229–236.

- Fillenberg S., Grau F., Seidel G. & Muller Y., (2015). Structural insight into operator *dre* -sites recognition and effector binding in the GntR/HutC transcription regulator NagR. *Nucleic Acids Research*, (2): 1283-1296.
- Galperin M., Nikolskaya A. & Koonin E., (2001). Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiology Letters.*, (1): 11-21
- García-Quintáns N., Repizo G., Martín M., Magni C. & López P., (2008). Activation of the Diacetyl/Acetoin Pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* CRL264 by acidic Growth. *Appl Environ Microbiol.*, (7):1988-96.
- Gu Q., Wu Q., Zhang J., Guo W., Ding Y., Wang J., Wu H., Sun M., Hou L., Wei X. & Zhang Y., (2018). Isolation and Transcriptome Analysis of Phenol-Degrading Bacterium From Carbon-Sand Filters in a Full-Scale Drinking Water Treatment Plant. *Front. Microbiol.*, (9):2162.
- Gu R., Li M., Su C., Long F., Routh M., & Yu E., (2008). Conformational change of the AcrR regulator reveals a possible mechanism of induction. *Acta Cryst. F Struct Biol Cryst Commun.* (7): 584-588.
- Hernández-Mendoza A., Martínez-Ocampo F., Lozano-Aguirre B., Popoca-Ursino E., 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 Announc*, (6):1-2.
- Ho Y.-N. & Huang C.-C., (2015). Draft genome sequence of *Burkholderia cenocepacia* strain 869T2, a plant-beneficial endophytic bacterium. *Genome Announc*, (6): 1-2.
- Huang Y., Lemieux M., Song J., Auer M. & Wang D., (2003). Structure and Mechanism of the Glycerol-3-Phosphate Transporter from *Escherichia coli* . *Science.*, (5633):616-620.
- Huang Y., Lemieux M., Song J., Auer M. & Wang D.-N., (2003). Structure and Mechanism of the Glycerol-3-Phosphate Transporter from *Escherichia coli*. *Science*, (5633): 616-620.
- Jain R., Dreisbach J. & Spain J., (1994). Biodegradation of *p*-nitrophenol via 1, 2, 4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. *Appl Environ Microbiol*, (8):3030-3032.

- Jiang D., Zhao Y., Wang X., Fan J., Heng J., Liu X., Feng W., Kang X., Huang B., Liu J. & Zhang X., (2013). Structure of the YajR transporter suggests a transport mechanism based on the conserved motif A. PNAS, (36): 14664-14669.
- Jiang D., Zhao Y., Wang X., Fan J., Heng J., Liu X., Feng W., Kang X., Huang B., Liu J. & Zhang X., (2013). Structure of the YajR transporter suggests a transport mechanism based on the conserved motif. Proc Natl Acad Sci U S A., (36):14664-14669.
- Kadiyala V. & Spain J., (1998). A two-component monooxygenase catalyzes both the hydroxylation of *p*-nitrophenol and the oxidative release of nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus sphaericus* JS905. Appl Environ Microbiol, (7):2479-2484.
- Kanekar P., Bhadbhade B. & Deshpand N., (.2004). Biodegradation of organophosphate pesticides. Proceedings of Indian National Sciences Academy, (1):57-70.
- Karigar C., and Rao S., (2011). Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants. Enzyme Research, (2011): 1-11.
- KaviKarunya S. & Reetha D. (2012). Biological degradation of chlorpyrifos and monocrotophos by bacterial isolates. International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives, (3):685-691.
- Khajamohiddin S., Babu P., Chakka D., Merrick M., Bhaduri A., Sowdhamini R. & Siddavattam D., (2006). A novel meta-cleavage product hydrolase from *Flavobacterium* sp. ATCC27551. Biochemical and Biophysical Research Communications., (3): 675-681
- Kim H. & Song H., (2005). Purification and characterization of NAD(P)H-dependent nitroreductase I from *Klebsiella* sp. C1 and enzymatic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene. Appl Microbiol Biotechnol (6): 766-773.
- Kitagawa W., Kimura N. & Kamagata Y., (2004). A novel *p*-nitrophenol degradation gene cluster from a gram positive bacterium, *Rhococcus opacus* SAO 101. J. Bacteriol, (15):4894-4902.
- Kumar S., Vikram S. & Raghava G., (2012). Genome Sequence of the Nitroaromatic Compound-Degrading Bacterium *Burkholderia* sp. Strain SJ98. J Bacteriol., (194): 3286-3282.
- Kumar S., Vikram S. & Raghava G., (2012). Genome Sequence of the Nitroaromatic Compound-Degrading Bacterium *Burkholderia* sp. Strain SJ98. J Bacteriol., (12): 3286.

- Kutty R. & Bennett G., (2005). Biochemical characterization of trinitrotoluene transforming oxygen-insensitive nitroreductases from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Arch Microbiol.*, (3): 158–167.
- Langendorf C., Key T., Fenalti G., Kan W., Buckle A., Caradoc-Davies T., Tuck K., Law R. & Whisstock, J., (2010). The X-ray crystal structure of *Escherichia coli* succinic semialdehyde dehydrogenase; structural insights into NADP⁺/enzyme interactions. *PLoS One*, (2).
- Larsen T., Boehlein S., Schuster S., Richards N., Thoden J., Holden H. & Rayment I., (1999). Three-Dimensional Structure of *Escherichia coli* Asparagine Synthetase B: A Short Journey from Substrate to Product. *Biochemistry.*, (49):16146-16157.
- Lau P., Wang Y., Patel A., Labbe D., Bergeron H., Brousseau R., Konishi Y., & Rawlings M., (1997). A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, (4): 1453–1458.
- Le. P., de Cima S., Bervoets I., Maes D., Rubio V. & Charlier D., (2015). Ligand binding specificity of RutR, a member of the TetR family of transcription regulators in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology* (1):76-84.
- Lim J., Choi B., Choi A., Kim K., Kim D., Choi I. & Ka J., (2012). Complete genome sequence of the fenitrothion-degrading *Burkholderia* sp. Strain YI23. *J Bacteriol.*, (194):896-896.
- Lim J., Choi B., Choi A., Kim K., Kim D., Choi I. & Ka J.,(2012). Complete genome sequence of the fenitrothion-degrading *Burkholderia* sp. Strain YI23. *J Bacteriol.*, (194): 896.
- 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. *Biochem Biophys Res Commun*, (4):1107-1114.
- Liu S., Su T., Zhang C., Zhang W., Zhu D., Su J., Wei T., Wang K., Huang Y., Guo L., Xu S., Zhou N. & Gu L., (2015). Crystal Structure of PnpCD, a Two-subunit Hydroquinone 1,2-Dioxygenase, Reveals a Novel Structural Class of Fe²⁺-dependent Dioxygenases., *J Biol Chem.*, (40):24547-24560.
- Liu W., Peterson P., Carter R., Zhou X., Langston J., Fisher A., & Toney M., (2004). Crystal structures of unbound and aminooxyacetate-bound *Escherichia coli* γ -aminobutyrate aminotransferase. *Biochemistry*, (34): 10896-10905.

- Love, M., Huber, W. & Anders, S., (2014). Moderate estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *GenomeBiology* (550):1-21.
- 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 shikimate pathway enzyme 5- enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Mol. BioSyst* (3):522-530.
- Maddocks S. & Oyston P., (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, (12): 3609–3623.
- MAFF/HSE (1995) Annual report of the working party on pesticide residue. HMSO.
- Manahan S., (1992). *Toxicological Chemistry*. Second edition.
- Martínez-Ocampo F., Lozano-Aguirre L.F., Hernández-Mendoza A., Rojas-Espinoza L.E., Popoca-Ursino E.C., Ortiz-Hernández M.L., Sánchez-Salinas E., Ramos Quintana F., Dantán-González E. (2015). *Burkholderia cenocepacia* strain CEIB S5-1, a rhizosphere-inhabiting bacterium with potential in bioremediation. *Genome Announc*, (2):1-2.
- McConnell R., Pacheoco F., Wahlberg K., Klein W., Malespin O., Magnotti R., Akerblorn M. & Murray D., (1999). Subclinical health effects of environmental pesticide contamination in a developing country: cholinesterase depression in children. *Environ Res*, (2): 87–91.
- Mogi T., Nakamura H. & Anraku Y., (1994). Molecular Structure of Heme-Copper Redox Center of *Escherichia coli* Ubiquinol Oxidase: Evidence and Model. *J. Biochem.*, (3):-471-477.
- Moody D., (2001). Genomics techniques: an overview of methods for the study of gene expression. *J. Anim. Sci.* (79): 128-135.
- Munnecke D., Hsieh D., (1976), Pathways of microbial metabolism of parathion. *Appl Environ Microbiol*, (1):63–69
- Munnecke, D., (1980). Enzymic detoxification of waste organophosphate pesticides. *J. Agric. Food Chem.* (28): 105-111.
- NCBI (2011). National Center for Biotechnology Information. Available at [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>]. Accessed June 30, 2011.

- Ortiz-Hernández M. (2002). Biodegradación de plaguicidas organofosforados por nuevas bacterias aisladas del suelo. Tesis doctoral en Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 1-27 pp.
- Pakala S. B., Gorla P., Pinjari A. B., Krovdi R. K., Baru R., Yanamandra M., Merrick M. and Siddavattam D., (2006). Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol: evidence for the presence of a p-nitrophenol 2-hydroxylase in a Gram-negative *Serratia* sp. Strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (6):1452-1462.
- Perry L. & Zylstra G., (2007). Cloning of a gene cluster involved in the catabolism of P-nitrophenol by *Arthrobacter* sp. Strain JS443 and characterization of the p-nitrphenol monooxygenase. *Journal of Bacteriology*, (21): 7563-7572.
- Phan G., Benabdelhak H., Lascombe M.-B., Benas P., Rety S., Picard M., Ducruix A., Etchebest C. & Broutin I., (2010). Structural and Dynamical insights into the opening mechanism of *P. aeruginosa* OprM channel. *Structure* (4):507-517.
- Pimenta A., Racher K., Jamieson L., Blight M. & Holland I., (2005). Mutations in HlyD, part of the type 1 translocator for hemolysin secretion, affect the folding of the secreted toxin. *Journal of Bacteriology.*, (21):7471-7480.
- Pinto A., Melo-Barbosa H., Miyoshi A., Silva A. & Azevedo V., (2011). Application of RNA-seq to reveal the transcript profile in bacteria. *Genet. Mol. Res.*, (3): 1707-1718.
- Podornaia A., Casino P., Marina A. & Laub M., (2013). Structural Basis of a Rationally Rewired Protein-Protein Interface Critical to Bacterial Signaling. *Structure.*, (9):1636-1647.
- Popoca-Ursino E., (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), Morelos, México.
- Post. (1998). Organophosphate (Post note 12). Parliamentary Office of science and Technology, London, UK.
- Qiu X.-H., Bai W.-Q., Zhong Q.-Z., Li M., He F.-Q. and Li B.-T., (2006). Isolation and characterization of a bacterial strain of the genus *Ochrobactrum* with methyl parathion mineralizing activity. *Appl Environ Microbiol.*, (5): 1364-5072.

- Quintero-García O.J. (2016). Evaluación de la expresión diferencial de proteínas en *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 durante la degradación de paratión metílico. Tesis de Licenciatura en Biología. Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Morelos, México.
- Ragnarsdottir KV (2000) Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. *J Geological Soc*, (157): 859–876.
- Rani N. & Lalithakumari D., (1994). Degradation of methyl parathion by *Pseudomonas putida*. *Can J Microbiol* (12):1000–1006
- Resch Y., Schiltz E., Titgemeyer F. & Muller Y., (2010). Insight into the induction mechanism of the GntR/ HutC bacterial transcription regulator. *Nucleic Acids Research*, (7): 2485–2497.
- Shen W., Liu W., Zhang J., Tao J., Deng H., Cao H. & Cui Z., (2010). Cloning and characterization of a gene cluster involved in the catabolism of p-nitrophenol from *Pseudomonas putida* DLL-E4. *Bioresource Technol* (19):7516–22.
- 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. SMSP-1 and cloning of the *ophc2* gene. *Biodegradation*. (5):785–792.
- Siddavattam D., Khajamohiddin S., Manavathi B., Pakala S.B., & Merrick M., (2003). Transposon-Like Organization of the Plasmid-Borne Organophosphate Degradation (*opd*) Gene Cluster Found in *Flavobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol.*, (5): 2533–2539.
- Singh B. & Wallker A., (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS. Microbiol Rev.*, (3), 428-471pp.
- Sogorb M., Vilanova E. & Carrera V., (2004). Future application of phosphotriesterases in the prophylaxis and treatment of organophosphorus insecticide and nerve agent poisoning. *Toxicol Lett.*, (1): 219–233.
- Sogorb M.A. & Vilanova E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol Lett.*, (1-3): 215–228.
- Sorek R. & Cossart P. (2010). Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nat. Rev. Genet.*, (1): 9-16.

- Spain J.C., Gibson D.T., (1991). Pathway for Biodegradation of p-Nitrophenol in a *Moraxella* sp. *Appl Environ Microbiol.*, (3):812-819.
- Symmons M., Bokma E., Koronakis E., Hughes C., and Koronakis V., (2009). The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *PNAS.*, (17): 7173-7178.
- Takeo M., Murakami M., Niihara S., Yamamoto K., Nishimura M., Kato D., Negoro S., (2008). Mechanism of 4-nitrophenol oxidation in *Rhodococcus* sp. strain PN1: characterization of the two-component 4-nitrophenol hydroxylase and regulation of its expression. *J Bacteriol.*, (22):7367-7374.
- Takeo M., Murakami M., Niihara S., Yamamoto K., Nishimura M., Kato D. & Negoro S., (2008). Mechanism of 4-nitrophenol oxidation in *Rhodococcus* sp. strain PN1: characterization of the two-component 4-nitrophenol hydroxylase and regulation of its expression. *J. Bacteriol.*, (22): 7367-7374.
- Tang J., Rose R.L., Chambers J.E., (2006). Metabolism of organophosphorus and carbamates pesticides. En: Gupta R, editor. *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds.* New York: Academic Press; p.127-43.
- Tatusov R., Galperin M., Natale D. & Koonin E., (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Research.*, (1):33-36.
- Tatusov R., Koonin E. & Lipman D. (1997). A Genomic Perspective on Protein Families. *SCIENCE* (5338): 631-637.
- Tawari, B., Verman, E., Chakraborty, S., Srivastava, A. (2018). Tolerance strategies in cyanobacterium *Fischerella* sp. under pesticides stress and possible role of a carbohydrate-binding protein in metabolism of methyl parathion (MP). *International Biodeterioration & Biodegradation.* (127): 217-226.
- Thorvaldsdóttir H., Robinson J., & Mesirov J., (2013). Integrative genomics viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* (2): 178-192.
- Toole G. & Toole S. (1995) *Understanding Biology.* Third edition. Stanley Thornes, Cheltenham, UK.
- Tropel D., & Vander Der Meer J., (2004). Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol. Mol Biol Rev.* (3): 474-500.

- Van den Heuvel R., Curti B., Vanoni M. & Mattevi A., (2004). Glutamate synthase: a fascinating pathway from L-glutamine to L-glutamate. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, (6):669-681.
- Van Vliet A., (2010). Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. *FEMS Microbiol. Lett.* (1): 1-7.
- Vanoni M. A., & Curti B., (1999). Glutamate synthase: a complex iron-sulfur flavoprotein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, (4), 617-638.
- Vikram S., Pandey J., Bhalla N., Pandey G., Ghosh A., Khan F., Jain R. & Raghava G., (2012). Branching of the p-nitrophenol (PNP) degradation pathway in *Burkholderia* sp. strain SJ98: evidences from genetic characterization of PNP gene cluster. *AMB Express* (1):1-30.
- Vikram S., Pandey J., Kumar S. & Raghava G., (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* (12):1-13.
- Wang P., Zhang M., Chao J. & Zhou Y., (2017). PnpM, a LysR-Type Transcriptional Regulator Activates the Hydroquinone Pathway in para-Nitrophenol Degradation in *Pseudomonas* sp. WBC-3. *Front. Microbiol.* (8):1714.
- Wang Z., Gerstein M., and Snyder M., (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* (1): 57-63.
- Watanabe M., Mogi T., Miyoshi H., Iwamura K., Adachi O. & Anraku Y., (1994). Structure-Function Studies on the Ubiquinol Oxidation Site of the Cytochrome *bo* Complex from *Escherichia coli* Using p-Benzoquinones and Substituted Phenols. *The Journal of Biological Chemistry*, (46):28899-28907.
- Wei M., Zhang J., Liu H., Zhou N., (2010). para-Nitrophenol 4-monooxygenase and hydroxyquinol 1,2-dioxygenase catalyze sequential transformation of 4-nitrocatechol in *Pseudomonas* sp. strain WBC-3. *Biodegradation* (6):915-921.
- Yang C., Dong M., Yuan Y., Huang Y., Guo X. & Qiao C., (2007). Reductive transformation of parathion and methyl parathion by *Bacillus* sp., *Biotechnol Lett.*, (3):487-493.

- Zhang J., Liu H., Xiao Y., Zhang X., Zhou N., (2009). Identification and characterization of catabolic para-nitrophenol 4-monooxygenase and para-benzoquinone reductase from *Pseudomonas* sp.strainWBC-3. *JBacteriol* (8):2703–2710.
- Zhang M., Zhang J., Jiang X., Chao J., & Zhou Y., (2015). Transcriptional activation of multiple operons involved in para-nitrophenol degradation by *Pseudomonas* sp. strain WBC-3. *Appl. Environ. Microbiol.* (1):220–230.
- Zhang S., Sun W., Xu L., Zheng X., Chu X., Tain J., Wu N. & Fan Y., (2012). Identification of the p-nitrophenol catabolic pathway, and characterization of three enzymes involved in the hydroquinone pathway, in *Pseudomonas* sp. 1-7. *BMC Microbiol.*, (12):27.
- Zomot E., Yardeni E., Vargiu A., Tam H.-K., Mallocci G., Ramaswamy V., Perach P., Pos K. & Bibi E., (2018). A new critical conformational determinant of multidrug efflux by MFS transporter. *J Mol Biol.*, (9): 1368–1385.

12. Anexos

ANEXO 1.

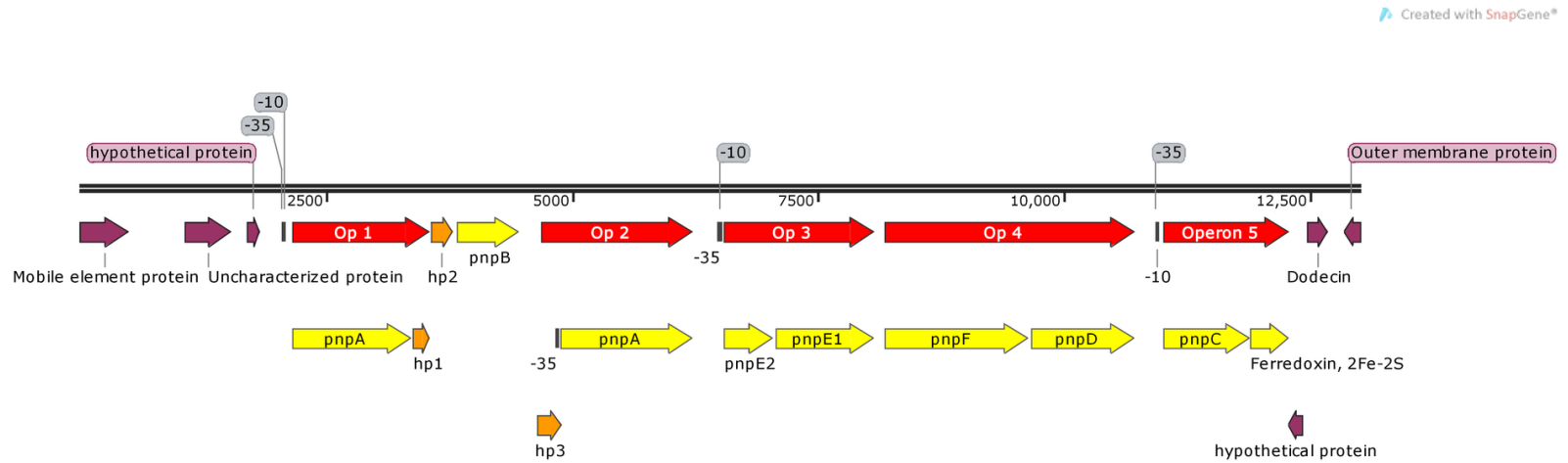


Figura A 1. Anotación preliminar de los genes involucrados en la degradación del PNP. Tomado de Fernández-López (2017)

ANEXO 2.

Figura A 2. Concentración e integridad del RNA total de *B. cenocepacia* (Bc). SP=Sin Paratión, PM=Paratión Metílico, R=No de réplica, t=tiempo de colecta.

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
Bc_R1_SP_t0	4409.5	ng/μl	110.238	53.738	2.05	1.97	RNA	40
Bc_R2_SP_t0	1534.2	ng/μl	38.355	19.144	2	1.66	RNA	40
Bc_R3_SP_t0	2295.8	ng/μl	57.396	27.809	2.06	1.94	RNA	40
Bc_R1_PM_t0	2572.7	ng/μl	64.316	42.34	1.52	1.5	RNA	40
Bc_R2_PM_t0	1006.5	ng/μl	25.162	17.729	1.42	1.12	RNA	40
Bc_R2_PM_t0	4103.6	ng/μl	102.59	51.06	2.01	2.12	RNA	40
Bc_R3_PM_t0	3714.9	ng/μl	92.873	45.797	2.03	1.92	RNA	40
Bc_R1_SP_t2	4726.1	ng/μl	118.153	59.506	1.99	2.09	RNA	40
Bc_R2_SP_t2	5712.5	ng/μl	142.813	71.707	1.99	2.09	RNA	40
Bc_R3_SP_t2	4451.2	ng/μl	111.28	55.83	1.99	2.11	RNA	40
Bc_R1_PM_t2	2950.4	ng/μl	73.759	36.264	2.03	2.06	RNA	40
Bc_R1_PM_t2	2564.4	ng/μl	64.11	31.6	2.03	2.03	RNA	40
Bc_R2_PM_t2	2884.6	ng/μl	72.115	40.437	1.78	1.81	RNA	40
Bc_R1_SP_t5h	3553.7	ng/μl	88.842	43.395	2.05	1.98	RNA	40
Bc_R2_SP_t5h	6231.2	ng/μl	155.78	78.052	2	1.21	RNA	40
Bc_R3_SP_t5hR	2533.3	ng/μl	63.332	31.03	2.04	1.88	RNA	40
Bc_R1_PM_t5hR	4496.4	ng/μl	112.411	53.314	2.11	2.23	RNA	40
Bc_R2_PM_t5h	2923.9	ng/μl	73.097	35.318	2.07	2.03	RNA	40
Bc_R3_PM_t5h	5894.7	ng/μl	147.369	74.494	1.98	2.01	RNA	40

ANEXO 3

Figura A 3. Concentración e integridad del RNA total de las 18 muestras posterior al tratamiento con DNAsa, de *B. cenocepacia* (Bc). SP=Sin Paratión, PM=Paratión Metfílico, r=No de réplica, t=tiempo de colecta.

#	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type
1	Bc_SP_r1_t0_DNase	962.3	ng/ μ l	24.056	11.468	2.1	2.25	RNA
2	Bc_SP_r2_t0_DNase	1205.8	ng/ μ l	30.144	14.371	2.1	1.71	RNA
3	Bc_SP_r3_t0_DNase	1136.9	ng/ μ l	28.422	13.55	2.1	2.12	RNA
4	Bc_PM_r1_t0_DNase	907.3	ng/ μ l	22.682	10.799	2.1	2.17	RNA
5	Bc_MP_r2_t0_DNase	2533.9	ng/ μ l	63.348	30.337	2.09	2.18	RNA
6	Bc_MP_r3_t0_DNase	650.3	ng/ μ l	16.257	7.833	2.08	2.11	RNA
7	Bc_SP_r1_t2_DNase	543.4	ng/ μ l	13.584	6.579	2.06	2.03	RNA
8	Bc_SP_r2_t2_DNase	1129.6	ng/ μ l	28.239	13.646	2.07	2.12	RNA
9	Bc_SP_r3_t2_DNase	646.7	ng/ μ l	16.168	7.81	2.07	2.12	RNA
10	Bc_MP_r1_t2_DNase	1878.1	ng/ μ l	46.952	24.709	1.9	1.91	RNA
11	Bc_MP_r2_t2_DNase	1566.6	ng/ μ l	39.166	18.574	2.11	2.22	RNA
12	Bc_MP_r3_t2_DNase	1223	ng/ μ l	30.576	14.609	2.09	2.32	RNA
13	Bc_SP_r1_t2_DNase	685.4	ng/ μ l	17.134	8.186	2.09	1.79	RNA
14	Bc_SP_r2_t2_DNase	166.4	ng/ μ l	4.161	2.395	1.74	1.25	RNA
15	Bc_SP_r3_t3_DNase	988	ng/ μ l	24.7	11.73	2.11	2.24	RNA
16	Bc_MP_r1_t3_DNase	550.1	ng/ μ l	13.752	6.826	2.01	1.21	RNA
17	Bc_MP_r2_t3_DNase	633.3	ng/ μ l	15.832	7.67	2.06	1.91	RNA
18	Bc_MP_r3_t3_DNase	828.1	ng/ μ l	20.701	9.843	2.1	1.77	RNA

ANEXO 4

Figura A 4. Concentración e integridad de los 18 RNA´s proporcionada por la empresa GENEWIX.

le/Name	GENEWIZ ID	Sample Type	Sample Vol. (ul)	Nanodrop 2000						Qubit				TapeStation
				Dilution Factor	Nucleic Acid Conc. (ng/ul)	Actual Nucleic Acid Conc. (ng/ul)	Total Amount (ng)	A260/A280	A260/A230	Dilution Factor	Nucleic Acid Conc. (ng/ul)	Actual Nucleic Acid Conc. (ng/ul)	Total Amount (ng)	RIN (for RNA)
19	ES19-19	total RNA	9	3	216.5	649.5	5845.5	2.02	2.28	6	82.4	494.4	4449.6	8.4
20	ES20-20	total RNA	9	3	190.4	571.2	5140.8	2.05	1.7	6	71	426	3834	8.6
21	ES21-21	total RNA	9	3	197.7	593.1	5337.9	2.05	2.11	6	65.2	391.2	3520.8	8.3
22	ES22-22	total RNA	9	3	200.4	601.2	5410.8	2.08	2.14	6	76	456	4104	8.7
23	ES23-23	total RNA	9	3	248.3	744.9	6704.1	1.98	2.33	6	84.8	508.8	4579.2	8.9
24	ES24-24	total RNA	9	3	191.7	575.1	5175.9	2.05	2.12	6	74.8	448.8	4039.2	8.6
25	ES25-25	total RNA	9	3	177.9	533.7	4803.3	2.1	1.97	3	126	378	3402	8.1
26	ES26-26	total RNA	9	3	130.3	390.9	3518.1	1.93	2.25	3	104	312	2808	7.5
27	ES27-27	total RNA	9	3	184.1	552.3	4970.7	2.05	2.03	3	170	510	4590	8.3
28	ES28-28	total RNA	9	3	165.2	495.6	4460.4	2.02	2.3	3	124	372	3348	8.2
29	ES29-29	total RNA	9	3	184.6	553.8	4984.2	2.04	2.2	3	138	414	3726	8
30	ES30-30	total RNA	9	3	213.5	640.5	5764.5	2.03	2.29	6	66	396	3564	8.6
31	ES31-31	total RNA	9	3	187.4	562.2	5059.8	2.03	1.76	3	132	396	3564	7.9
32	ES32-32	total RNA	15	3	93.32	279.96	4199.4	1.97	1.89	3	75.4	226.2	3393	6.8
33	ES33-33	total RNA	9	3	175.9	527.7	4749.3	2.06	2.2	3	130	390	3510	8.1
34	ES34-34	total RNA	9	3	172.9	518.7	4668.3	2.04	1.33	3	112	336	3024	8
35	ES35-35	total RNA	9	3	176.1	528.3	4754.7	2.08	1.86	3	134	402	3618	7.7
36	ES36-36	total RNA	9	3	166.3	498.9	4490.1	2.06	1.69	3	132	396	3564	8.4

ANEXO 5

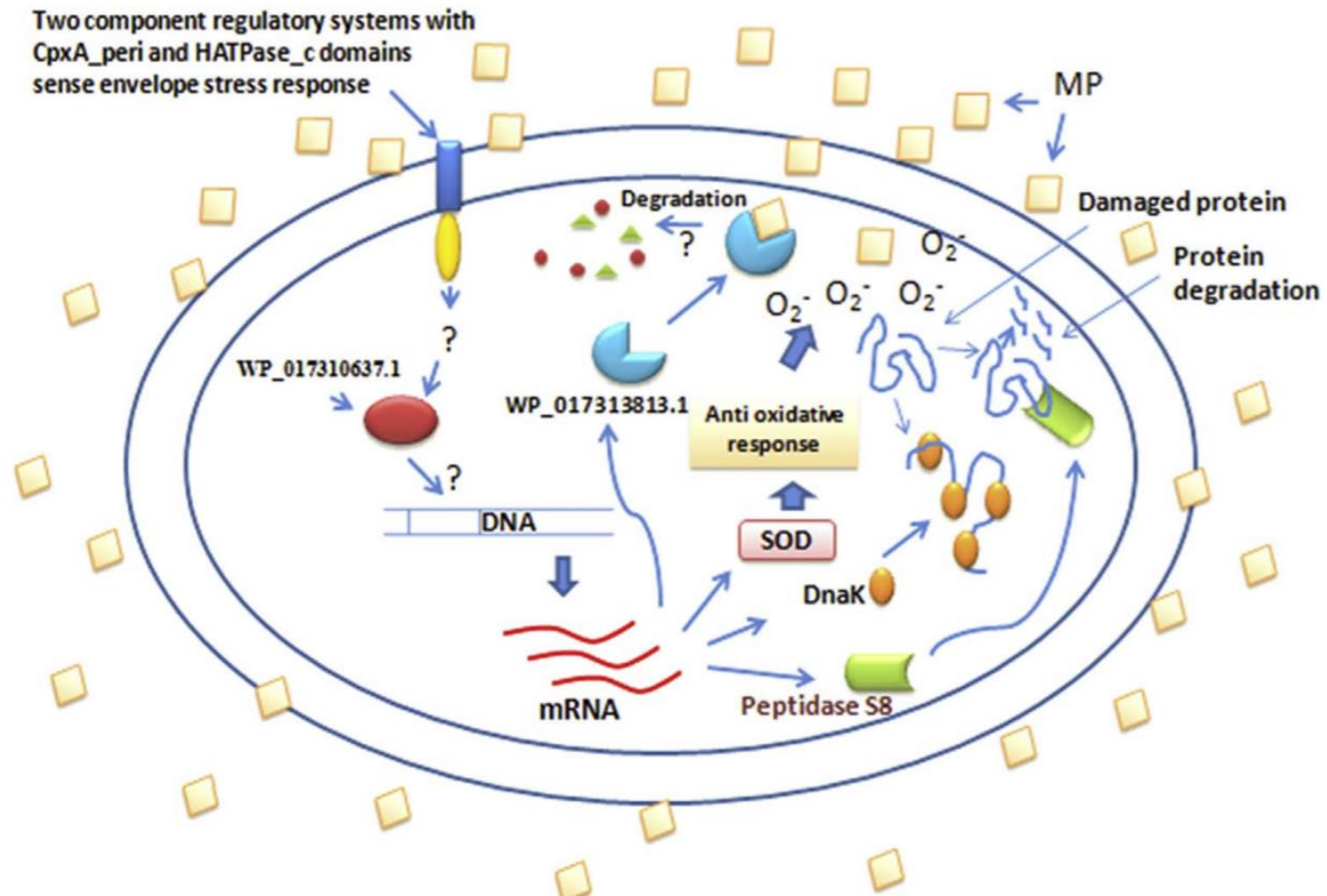


Figura A 5. Representación esquemática del probable mecanismo de tolerancia y degradación de MP por *Fischerella* sp., propuesto por Tiwari y colaboradores

ANEXO 6

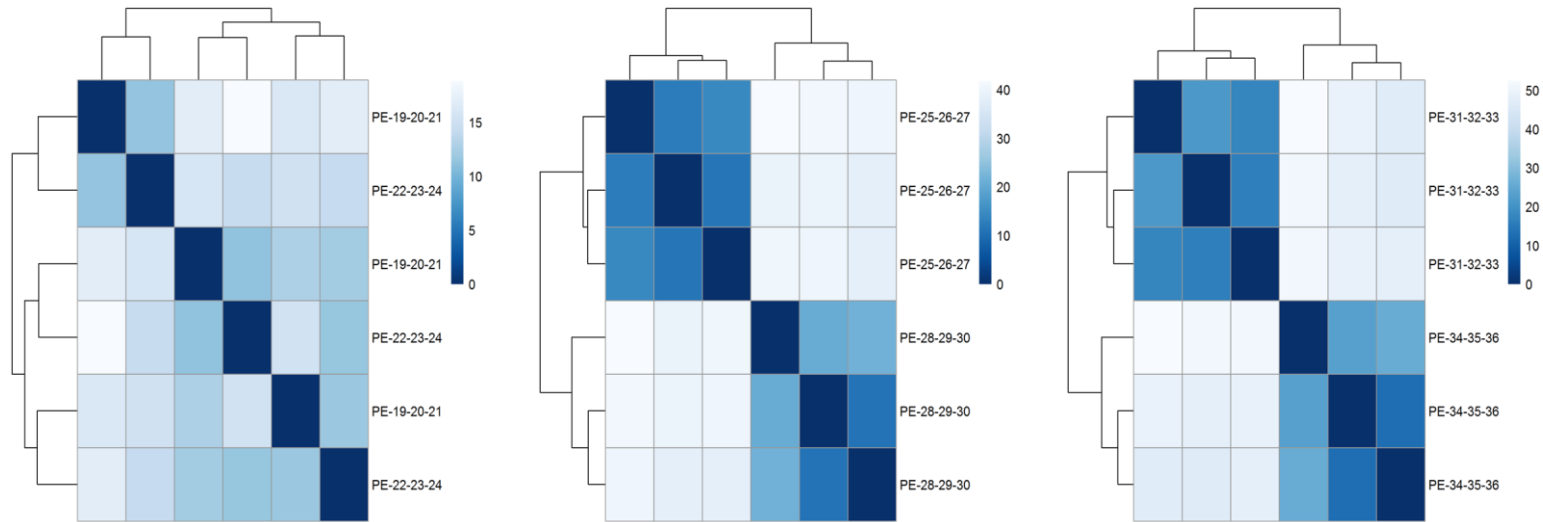


Figura A 6. Agrupamiento de las réplicas por tiempo. El panel a) corresponde al tiempo 0, el panel b) al tiempo 2 y, por último, el panel c) corresponde al tiempo 5 hrs. La agrupación de las lecturas se realizó por réplica y condiciones.

ANEXO 7

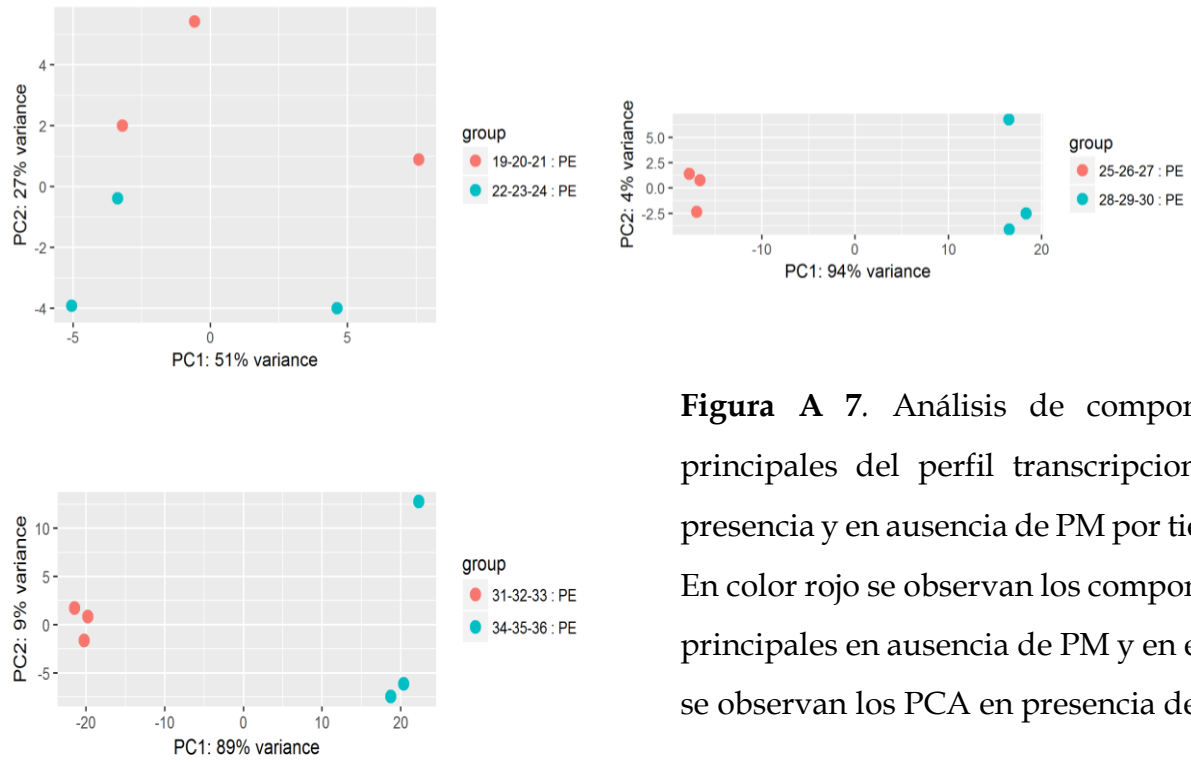


Figura A 7. Análisis de componentes principales del perfil transcripcional en presencia y en ausencia de PM por tiempo. En color rojo se observan los componentes principales en ausencia de PM y en el azul se observan los PCA en presencia de PM

ANEXO 8

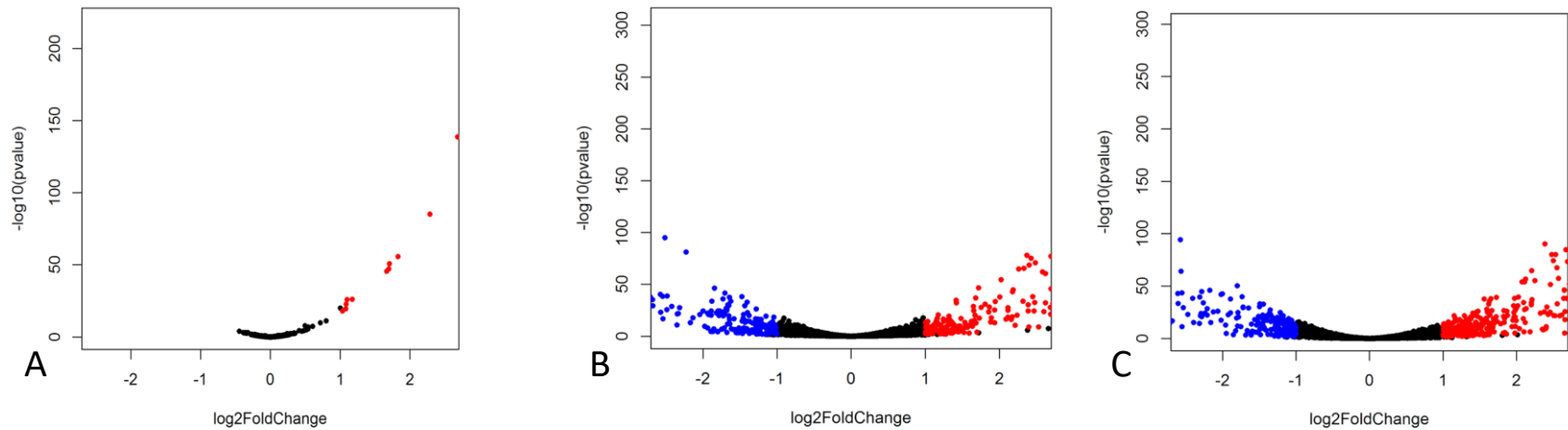


Figura A 8. Expresión diferencial de los genes de *B. cenopacia* CEIB S5-2 entre ambas condiciones y la significancia de los mismos. En el panel A) se grafican los valores del T_0hrs, mientras que en el panel B) y C) los valores de los tiempos 2hrs y 5hrs, respectivamente. En color rojo se observan los genes con un fold change mayor a 2 PM y en color azul los genes SP.



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 05 de Marzo de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández (Tutor principal)
Dr. Edgar Dantán González (Co Tutor)
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dr. Armando Hernández Mendoza
Dr. Emmanuel Salazar Bustamante

Tesis: **“ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE LA
CEPA *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 EN EL
PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE
PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS”**

Alumno que la presenta a revisión: **YITZEL GAMA MARTINEZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

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
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 05 de Marzo de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández (Tutor principal)
Dr. Edgar Dantán González (Co Tutor)
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dr. Armando Hernández Mendoza
Dr. Emmanuel Salazar Bustamante

Tesis: **“ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE LA
CEPA *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 EN EL
PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE
PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS”**

Alumno que la presenta a revisión: **YITZEL GAMA MARTINEZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE


DR. EDGAR DANTAN GONZALEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 05 de Marzo de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández (Tutor principal)
Dr. Edgar Dantán González (Co Tutor)
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dr. Armando Hernández Mendoza
Dr. Emmanuel Salazar Bustamante

Tesis: "**ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE LA
CEPA *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 EN EL
PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE
PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS**"

Alumno que la presenta a revisión: **YITZEL GAMA MARTINEZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE


DR. EMMANUEL SALAZAR BUSTAMANTE



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 05 de marzo de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández (Tutor principal)
Dr. Edgar Dantán González (Co Tutor)
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís
Dr. Armando Hernández Mendoza
Dr. Emmanuel Salazar Bustamante

Tesis: **“ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE LA
CEPA *Burkholderia cenocepacia* CEIB S5-2 EN EL
PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE
PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS”**

Alumno que la presenta a revisión: **YITZEL GAMA MARTINEZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS