

**Universidad Antonio Nariño
Facultad de Ciencias
Programa de Maestría en Bioquímica**

**IDENTIFICACIÓN *in silico* DE LA CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE
GLIFOSATO POR *Pseudomonas extremaustralis***

YISETH FANDIÑO MORENO

**Bogotá - Colombia
2023**

**IDENTIFICACIÓN *in silico* DE LA CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE
GLIFOSATO POR *Pseudomonas extremaustralis***

YISETH FANDIÑO MORENO

Tesis presentada como requisito para optar al título de
Magister en Bioquímica

Director:
Silvio Alejandro López Pazos M.Sc., Ph.D.

**Universidad Antonio Nariño
Facultad de Ciencias, Programa de Bioquímica
Bogotá - Colombia
2023**

DEDICATORIA

*Simplemente a Dios y a mi Madre,
porque siempre están y no me dejaron desfallecer
en las peores situaciones
cuando se siente el mundo acabar*

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a la Universidad Antonio Nariño, institución que me brindó la oportunidad para realizar mis estudios de Maestría, y de la cual siempre he recibido su apoyo.

A la profesora Vaneza Paola Loret Velásquez, quien me acompañó y me brindó sabiduría en este proceso, y a cada uno de los docentes que me aceptaron en su salón de clase para aprender, y me brindaron simplemente su amistad.

Al profesor Silvio Alejandro López Pazos, director de la presente tesis, por su dirección, paciencia, entrega y valiosos consejos que me permitieron alcanzar los objetivos.

A la profesora Anny Karely Rodríguez Fersaca, por su apoyo y colaboración en el desarrollo de esta labor y sus invaluable consejos.

A mis padres Ana Cecilia y Virgilio, mis hermanos y sobrinos, que son mi eje central y me inculcaron la perseverancia para vencer las dificultades.

Finalmente, a todas a aquellas personas que directa o indirectamente me aportaron con su ayuda, paciencia y tiempo, para la culminación de este proyecto, trazado como uno de mis objetivos de vida. A todos ellos, solo me queda agradecerles infinitamente.

RESUMEN

El glifosato es un herbicida organofosforado aplicado en el mundo en el ámbito agrícola, forestal y urbano. Cuenta con cifras de uso entre 600 - 750 mil toneladas, proyectándose aumento a 740 - 920 mil toneladas para 2025. El glifosato es desarrollado por empresas como Syngenta, Bayer, BASF y Dow Chemical. Debido a su eficiencia de uso en el control de malezas ha tenido uso indiscriminado, lo que ha generado preocupaciones de posibles afectaciones en aspectos ambientales y humanos. Actualmente la degradación de glifosato se encuentra determinada por métodos químicos o biológicos, incluyendo fotólisis, oxidación del ozono, o degradación microbiana, siendo este último prometedor en reducir los niveles de este herbicida en suelo. La presente investigación contempló la revisión de patentes relacionadas con degradación de glifosato por bacterias, incluyendo propietarios de la tecnología y vigencias de las mismas, encontrándose especial enfoque por China en el desarrollo de métodos asociados. Además aporta la identificación *in silico* de los factores proteicos que podrían estar asociados a la degradación de glifosato por la bacteria asociada a ambientes extremos (bajas temperaturas en este caso) *Pseudomonas extremaustralis*, realizándose una caracterización bioquímica de las proteínas asociadas, usando herramientas de Bioinformática, en el modelo genómico de *P. extremaustralis* 2E-UNG. Se utilizaron tres rutas metabólicas enfocadas en la degradación de glifosato, una que depende de la enzima glifosato-oxidoreductasa, una segunda que depende de la enzima glicina oxidasa, y una última que contiene siete enzimas. El análisis de las secuencias permite entrever que la enzima glifosato-oxidoreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG sería el portaestandarte de la degradación de glifosato para este caso, apoyado en los datos de parámetros como punto isoeléctrico, residuos positivos y negativos, índice alifático, índice GRAVY, índice de hidropaticidad, residuos accesibles, regiones antigénicas, o estructura secundaria, entre otros,

apoyando la idea de que *P. extremaustralis* 2E-UNG y otras cepas relacionadas, son una opción para la biorremediación de glifosato.

Palabras claves: Glifosato, Biorremediación, *Pseudomonas extremaustralis*, Patente, Glifosato-oxidorreductasa

ABSTRACT

Glyphosate is a widely utilized organophosphate herbicide in commercial agriculture, forestry and urban areas. It has usage between 600 - 750 thousand tons, projected to increase to 740 - 920 thousand tons by 2025. Glyphosate is developed by companies such as Syngenta, Bayer, BASF, and Dow Chemical. Due to its efficiency in weed control, it has been used indiscriminately, which has generated concerns about possible environmental and human impacts. Currently, glyphosate degradation is determined by chemical or biological methods, including photolysis, ozone oxidation or microbial degradation, the latter being a promising method to reduce the levels of this herbicide in soil. This research contemplates a review of patents linked to the remediation of glyphosate by bacteria, including technology owners, expiration date, it was found a special interest in China for associated methods. In addition, this project provides an *in silico* identification of the factors that could be associated with glyphosate degradation by the extreme environment related bacterium *P. extremaustralis*, and a biochemical characterization of the associated proteins, using bioinformatics tools. Three metabolic pathways focused on glyphosate degradation were used, the first one rest on on the enzyme glyphosate oxidoreductase, the second one is connected to glycine oxidase, and a last one is compose of seven enzymes. Sequence analysis suggests that the glyphosate oxidoreductase enzyme from *P. extremaustralis* 2E-UNG would be a standard for glyphosate degradation, it is supported by parameters such as isoelectric point, positive and negative residues, aliphatic index, GRAVY index, hydropaticity index, accessible residues, antigenic regions or secondary structure, among others. *P. extremaustralis* 2E-UNG and other related strains are an option for glyphosate bioremediation.

Keywords: Glyphosate, Bioremediation, *Pseudomonas extramaustralis*, Patent, Glyphosate oxidoreductase

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE TABLAS	11
INTRODUCCIÓN	12
MARCO TEÓRICO.....	16
GLIFOSATO	16
PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL GLIFOSATO	18
ÁCIDO AMINOMETILFOSFÓNICO - AMPA	20
GLIFOSATO EN MATRICES AMBIENTALES Y SU TOXICIDAD	20
<i>Glifosato en agua</i>	21
<i>Glifosato en suelo</i>	21
<i>Glifosato en aire</i>	22
<i>Glifosato en alimentos</i>	22
RUTAS METABÓLICAS DE DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO POR MICRORGANISMOS	22
POSIBLES AFECTACIONES DEL GLIFOSATO	24
EL GÉNERO <i>Pseudomonas sp.</i>	25
LA BACTERIA <i>Pseudomonas extremaustralis</i>	27
BIORREMEDIACIÓN	29
<i>Remediación del Glifosato</i>	30
PATENTE.....	31
<i>Obtención de una patente</i>	32
<i>Condiciones</i>	32
<i>Costos</i>	32
<i>Redacción de una solicitud de patente</i>	33
<i>Proceso de patentamiento</i>	33
OBJETIVOS	35
Objetivo General	35
Objetivos Específicos	35
METODOLOGÍA	36

ESTUDIO DE PATENTES RELACIONADO CON DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO POR BACTERIAS.....	36
IDENTIFICACIÓN <i>in silico</i> DE ENZIMAS ASOCIADAS A DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO EN <i>Pseudomonas extremaustralis</i>	36
CARACTERIZACIÓN <i>in silico</i> DE ENZIMAS RELACIONADAS CON DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO EN <i>Pseudomonas extremaustralis</i>	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
ESTUDIO DE PATENTES RELACIONADAS CON DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO POR BACTERIAS.....	38
DETERMINACIÓN <i>in silico</i> DE RUTAS METABÓLICAS Y ENZIMAS IMPLICADAS EN LA DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO POR <i>Pseudomonas extremaustralis</i>	45
CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO EN <i>Pseudomonas extremaustralis</i> 2E-UNGS	53
CONCLUSIONES	65
GLOSARIO	67
REFERENCIAS.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del glifosato diseñada bajo la herramienta ChemDraw 12.0.2.1076	17
Figura 2. Estructura química de las sales del ácido glifosato	18
Figura 3. Equilibrios iónicos del glifosato de acuerdo al pH del medio de las diferentes especies de glifosato en función del pH	19
Figura 4. Estructura química del ácido aminometilfosfónico (AMPA), diseñado bajo la herramienta ChemDraw 12.0.2.1076	19
Figura 5. Equilibrios ácidos-base del AMPA y sus pKa correspondientes	20
Figura 6. Vías de degradación del glifosato	23
Figura 7. Proceso general para obtener una patente	25
Figura 8. Rutas de degradación del glifosato y enzimas presentes en el proceso identificadas en la base de datos MetaCyc	47
Figura 9. Análisis de las secuencias relacionadas con degradación de glifosato para identidad	52
Figura 10. Box plot de las secuencias relacionadas con degradación de glifosato para identidad	53
Figura 11. Box plot de las secuencias relacionadas con degradación de glifosato para cobertura	53
Figura 12. Alineamiento de secuencias de la enzima glifosato-oxidoreductasa de <i>P. extremaustralis</i> 2E-UNG y su contraparte de Swiss-Prot (Q6FFR5.1)	59
Figura 13. Resultado del análisis de hidropaticidad de Kyle y Doolittle para la enzima glifosato-oxidoreductasa de <i>P. extremaustralis</i> 2E-UNG	60
Figura 14. Análisis de aminoácidos accesibles para la enzima glifosato-oxidoreductasa de <i>P. extremaustralis</i> 2E-UNG	61
Figura 15. Análisis de flexibilidad para la enzima glifosato-oxidoreductasa de <i>P. extremaustralis</i> 2E-UNG	62
Figura 16. Comparación de secuencias para la enzima glifosato-oxidoreductasa de <i>P. extremaustralis</i> 2E-UNG	63
Figura 17. Perfil de antigenicidad para la enzima glifosato-oxidoreductasa de <i>P. extremaustralis</i> 2E-UNG	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información de patentes asociadas a degradación de glifosato por bacterias	40
Tabla 2. Reivindicaciones de patentes bajo el tema de degradación de glifosato por bacterias	41
Tabla 3. Enzimas relacionadas con degradación de glifosato desde las bases de datos Metacyc, Swiss- Prot y el genoma de <i>P. extremaustralis</i> cepa 2E-UNGS	49
Tabla 4. Resultados de Protparam para caracterización bioquímica en las enzimas asociadas a degradación de glifosato en <i>P. extremaustralis</i> 2E-UNGS	56



INTRODUCCIÓN

La agricultura se encuentra definida como la producción, comercialización y abastecimiento de cultivos, siendo este sector la columna de un sistema económico que contribuye al progreso social [1]. La Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) describe que la superficie destinada a la agricultura es de aproximadamente de 5000 megahectáreas (Mha) a nivel mundial, mientras que las restantes dos partes corresponden a praderas y pastizales para cebsa [2]. Con el aumento de la población la búsqueda de métodos eficientes de producción de alimentos ha ganado una importancia considerable. Bajo este fin, los pesticidas y los fertilizantes se han utilizado ampliamente para cumplir con los crecientes requisitos de producción de alimentos [3]. El compuesto N-fosfonometil glicina, o glifosato, ha sido el herbicida más manejado en atención a su mecanismo de acción no selectivo, que inhibe eficazmente la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de la vía del shikimato, que se encuentra en plantas y en algunas bacterias, esta característica ha permitido el control de malezas en producción de cultivos de soja, algodón y maíz entre otros [4], [5]. El control de malezas utiliza entre 600 - 750 mil toneladas de glifosato en el mundo, proyectándose que esta cifra cambie a 740 - 920 mil toneladas para 2025 [6].

El glifosato se introdujo como herbicida comercial para aplicaciones agrícolas a mediados de 1970 por la empresa Monsanto, con su uso mundial cada vez más amplio se han planteado preocupaciones sobre sus posibles amenazas para el medio ambiente, específicamente en la contaminación de suelos, ambientes acuáticos [7] o efectos tóxicos hacia los humanos. Esto debido a que la degradación de este herbicida va acompañada de la producción de metabolitos como el ácido aminometilfosfónico (AMPA), el cual es el metabolito más tóxico y resistente que



el glifosato, además de la sarcosina y la glicina. Bajo estas consideraciones, se ha justificado las inquietudes en tres aspectos, que incluyen el desarrollo de malezas resistentes al glifosato, teniendo como consecuencia que se utilicen mayores concentraciones a nivel mundial [6], por ejemplo China, un primordial productor y exportador de glifosato, ha registrado que la producción para 2010 fue de 850.000 toneladas, y estas cifras se encuentran en continuo aumento. En los últimos años se ha introducido en algunos países regulaciones que restringen el uso del glifosato en la agricultura [8] En segundo lugar, se consideran los posibles efectos toxicológicos, en particular en relación a la exposición humana. En el 2015 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) determinó clasificar este herbicida como probablemente cancerígeno para humanos, señalando evidencia asociada al linfoma no Hodgkin (LNH) y algunos estudios epidemiológicos [9], aunque luego esta categoría fue reconsiderada debido a diversas publicaciones arbitradas [10]. Asimismo se ha explicado que el glifosato puede tener propensión para la incidencia de carcinoma de túbulo renal y hemangiosarcoma en ratones [11]. Otro aspecto a considerar fue el presentado por parte de la Agencia Europea de productos Químicos (ECHA) en 2023 que generó la siguiente conclusión: *“no se identificó riesgos relacionados con las sustancias activas del glifosato para los seres humanos, los animales o el medio ambiente”*, decisión obtenida posterior a la evaluación de miles de estudios científicos revisados por pares hasta la vigencia 2022, concluyendo que no se verificaba los criterios acreditados para ser catalogado como sustancia cancerígena o tóxica para la reproducción, aducido a la falta de información sobre la toxicidad de alguno de sus componentes. Con relación a la biodiversidad, expertos reconocieron peligros relacionados a usos del glifosato son complicados y estriban en variados factores, también señalo carencia de métodos validados que permitan sacar conclusiones. Por último, con respecto a ecología, la información disponible



admitió riesgo de prolongado término para mamíferos en 12 usos de los 23 propuestos para el herbicida [12]. En cuanto a los posibles efectos ambientales y ecológicos, se ha encontrado que puede alterar la ecología microbiana del suelo afectando enzimas [13], de igual manera puede alterar negativamente a los microorganismos promotores del crecimiento de las plantas, que incluye especies de bacterias como *Burkholderia sp.*, *Pseudomonas sp.* y Rizobios [14]. Otro aspecto para tener en cuenta es la evidencia de la vida media del glifosato en una amplia gama de suelos y medios acuáticos, variando entre algunos días que pueden ser meses o años, dependiendo de la composición del suelo, la formulación utilizada y las condiciones climáticas [15]. Por lo anteriormente expuesto, es necesario descontaminar efectivamente las matrices ambientales en la que interactúa el glifosato, sin embargo se ha evidenciado que los métodos químicos utilizados tienen problemas de remoción completa, generando altos costos y produciendo riesgos de transporte intermedio [16], es por ello que la biodegradación microbiana de glifosato se ha convertido en una de las estrategias principales para la descontaminación de suelos [17], considerándose una alternativa eficiente, de bajo costo, y respetuosa con el ambiente para la remediación de ambientes contaminados [11].

Otros aspectos a evaluar son los relacionados a los Derechos de Propiedad Intelectual (DPI) asociados a la Biotecnología, que incluyen patentes, diseños industriales, derechos de obtentor de variedades vegetales, y secretos comerciales. Todo desarrollo biotecnológico debe contemplar estudio de este tipo de derechos para entrever las posibilidades de irrupción en el mercado de una nueva tecnología, el panorama para su desarrollo y escalamiento, y medidas para evitar infringir derechos de terceros [10].



Bajo las consideraciones presentadas, la biodegradación directa del glifosato en el ambiente está impulsada principalmente por vías bióticas mediadas por bacterias, actinomicetos y hongos que descomponen al glifosato en moléculas más pequeñas. Uno de los géneros más estudiados en esta función ha sido el género *Pseudomonas sp.*, que puede usar el glifosato como única fuente de fósforo o de carbono [18]. Una especie interesante es *P. extremaustralis*, asociada a ambientes extremos de baja temperatura y productora de biopolímeros para su supervivencia, de la cual se conoce su capacidad de remediación de compuestos tóxicos para el ambiente o salud humana [19] [20]. El desarrollo de la presente investigación contempla la revisión de patentes relacionadas con la degradación de glifosato por bacterias, incluyendo propietarios de la tecnología y vigencia de la misma. Además, aporta la determinación *in silico* de los factores proteicos que podrían estar asociados a la degradación de glifosato por *P. extremaustralis*, para finalmente realizar caracterización bioquímica de las proteínas asociadas usando herramientas de Bioinformática.

MARCO TEÓRICO

GLIFOSATO

Históricamente los agricultores utilizaron una variedad de métodos para controlar las malezas, en primer lugar se aplicaba la limpieza mecánica, implementos manuales y herramientas de arado para arrastrar maleza. A mediados del siglo XIX se comenzó con el uso de compuestos inorgánicos (como sales, azufre y cal), y en 1930 se incluyó electricidad y fuego [21]. Para 1940 se inició con la aplicación de compuestos químicos orgánicos. El primer herbicida químico moderno fue el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), comercializándose entre 1950 y 1960 [22].

El glifosato se sintetizó químicamente en 1950 por Henri Martín de la compañía Cilag, la cual fue adquirida en 1959 por Johnson y Johnson, que vendió la fórmula del glifosato a Aldrich Chemical. La compañía Monsanto, con John Franz, en mayo de 1970 sintetizó el glifosato y realizó pruebas en un invernadero, para ser finalmente presentado como el herbicida comercial Roundup [23].

La nomenclatura de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) registra al glifosato como N-(fosfonometil) glicina ($C_3H_8NO_5P$) (Figura 1) [24], corresponde al grupo G glicinas (glifosato y sulfonato) según información del Comité de Acción de Resistencia a los Herbicidas (HRAC). El herbicida inhibe la ruta asociada con la enzima 5-enolpiruvilshikimato - 3- fosfato sintasa (EPSPS) que pertenece al ruta del shikimato para producción de aminoácidos aromáticos en vegetales [25].

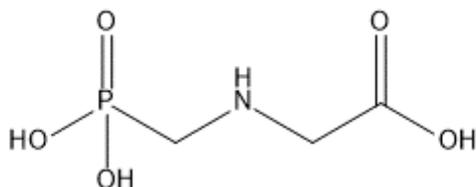


Figura 1. Estructura química del glifosato diseñada bajo la herramienta ChemDraw 12.0.2.1076

Se ha descrito que el glifosato posee toxicidad mínima para el ambiente cuando se compara con otras moléculas de la misma utilidad. Sin embargo las aplicaciones de glifosato, la duración promedio es variable y puede extenderse entre los 7 - 315 días, causando acumulación en aguas que puedan estar influenciadas [26]. El glifosato como producto es una sal de ácido desprotonado de glifosato y un catión de isopropilamina o trimetilsulfonio (Figura 2), entre este grupo de sales se encuentran isopropilamina, sales de sodio, tetrametilsulfónico (glifosato trimesium), sales de potasio o amonio, monoetanolamina y dimetilamina. Los productos en el mercado tienen coadyuvante para contrarrestar la baja liposolubilidad del glifosato que podría interferir con la penetración en las plantas, y de esta forma el producto comercial se comercializa como sal necesario para el peso final en la gota [27].

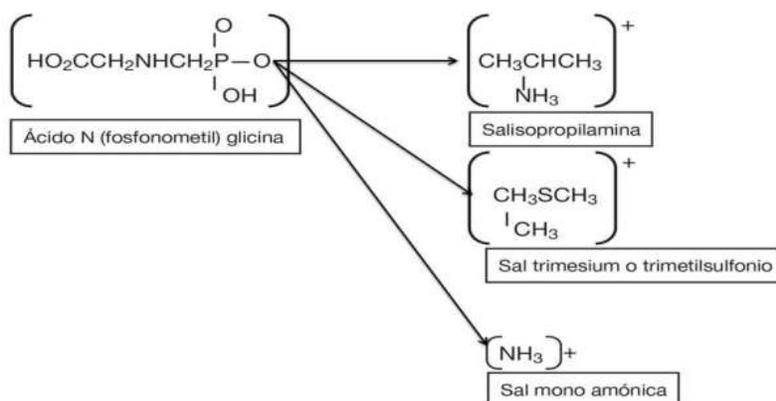


Figura 2. Estructura química de las sales del ácido glifosato [27].

La tasa de aplicación recomendada del glifosato se ha descrito entre $0.72 - 2.88 \text{ Kg}^{-1} \text{ Ha}^{-1}$ constituyendo un solo tratamiento, en una a tres veces por año dependiendo del cultivo [28], teniendo en cuenta que una fracción es la que alcanza el objetivo de acción en la planta, y es posible que el 50% quede en el suelo [29]. La vida media de glifosato corresponde a 7-28 días, lo cual puede cambiar según las propiedades del suelo, y factores climáticos [30]. Se calcula que quizás se da acrecentamiento de 1 mg de glifosato Kg^{-1} suelo por cada grupo de cinco rociados, esto apuntaría a pensar que se aplica más producto a base de glifosato, y se acumularía al menos temporalmente en parte porque no se dispersaría suficientemente rápido, el herbicida y el ácido aminometilfosfónico (AMPA), el más importante metabolito subproducto de su degradación, serían sustancias de potencial tóxico pseudopersistentes [31] en concentraciones desde 0.05 mg Kg^{-1} e incluso llegar a 1000 mg Kg^{-1} en información de la Unión europea [30].

PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL GLIFOSATO

El glifosato tiene propiedades zwitteriónicas con grupos ácidos y básicos, concretamente un grupo fosfónico, un grupo carboxilo y un grupo amino. La molécula tiene varias constantes de

disociación (Figura 3): $pK_{a1}=0.78$, $pK_{a2}=2.29$, $pK_{a3}=5.96$ y $pK_{a4}=10.98$, estas constantes de disociación hace que pueda reaccionar con compuestos polares y coloides, y se absorbe en aquellos espacios de alta actividad en suelos con elevado intercambio iónico [32].

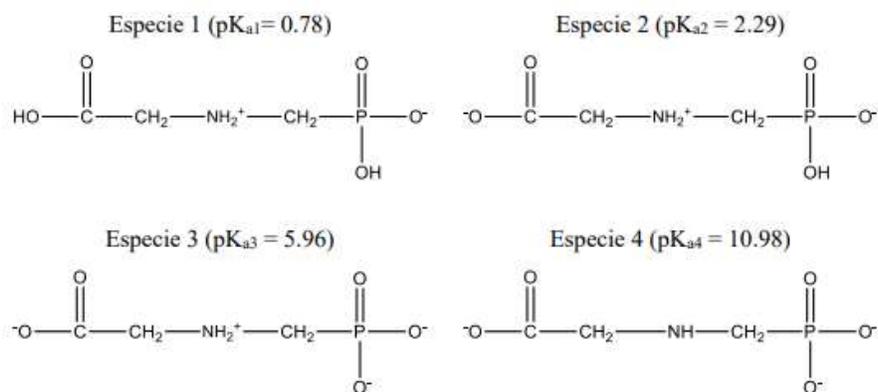


Figura 3. Equilibrios iónicos del glifosato de acuerdo al pH del medio según las constantes de disociación [32].

El herbicida exhibe coeficiente de ruptura de carbono orgánico/agua de $K_{co} = 21.699 \text{ ml g}^{-1}$, esto representa que probablemente pequeñas concentraciones del producto son incorporados en fuentes acuáticas de diverso tipo, incluyendo las relacionadas al suelo [33]. El glifosato es sólido cristalino, blanco y sin olor, cuya fórmula molecular es $C_3H_8NO_5P$, con una masa de 169.1 g/mol, es soluble en agua a 12.000 ppm (25°C , densidad de 0.5 g mL^{-1} , punto de fusión 184.5°C), es estable durante unos 32 días (25°C , $\text{pH}=5.7 - 9.0$) según algunos estudios que lo describen [34].

Este herbicida se mineraliza o puede lixiviarse en el suelo, pero no volatiliza por una presión de vapor disminuida por la alta polaridad, el glifosato en la práctica es insoluble en etanol, acetona y benceno [33].

ÁCIDO AMINOMETILFOSFÓNICO - AMPA

El AMPA ($\text{CH}_6\text{NO}_3\text{P}$) (Figura 4) tiene propiedad anfotérica, además de algunas constantes de disociación: $\text{pK}_a^1=0.9$, $\text{pK}_a^2=5.6$, $\text{pK}_a^3=10.2$ (Figura 5) [33], como se mencionó antes, el AMPA se constituye en el principal metabolito del glifosato.

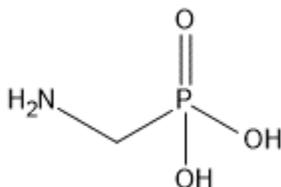


Figura 4. Estructura del AMPA, diseñado bajo la herramienta ChemDraw 12.0.2.1076.

Cuando sucede la degradación del glifosato, se lleva a cabo la hidrólisis a AMPA, esta sustancia se compone de un ácido orgánico débil poco tóxico, que además contiene en la estructura un grupo de ácido fosfórico [35].

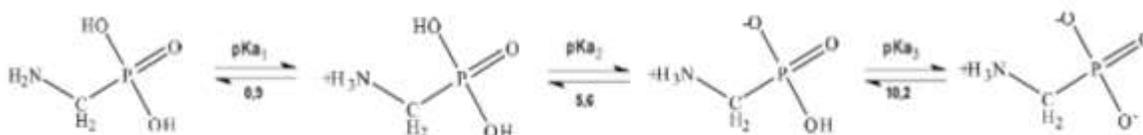


Figura 5. Equilibrios ácido-base del AMPA, incluyendo pK_a s [33].

El AMPA es un compuesto polar, soluble en agua, su vida media es de tres años según algunos reportes. El AMPA se identificó en las lechugas, cuando se hicieron aspersiones con glifosato durante un año, este fenómeno también sucedió con la cebada [36].

GLIFOSATO EN MATRICES AMBIENTALES Y SU TOXICIDAD



Glifosato en agua

El glifosato es soluble en agua (10.000 mg L^{-1} - 15.700 mg L^{-1} , 1-25°C), por lo cual se puede distribuir en fuentes de agua y entornos relacionados acuáticos [37]. Este herbicida se puede intercambiar en el agua porque esta fluye desde los cultivos, por pulverización, y también aspersión directa o indirecta [38]. Los restos del herbicida son captados en partículas coloidales que caen en los depósitos de la profundidad de todo entorno acuático permaneciendo durante 12-80 días [39]. La toxicidad del glifosato en cuerpos de agua termina con alteraciones en las propiedades del agua y puede alcanzar a los seres vivos, transformando la organización y ecofunciones de entornos acuáticos. Los efectos nocivos envuelven retraso en el desarrollo de algas y peces, afectación del nacimiento en erizos, modificaciones histológicas de las branquias de peces como la tilapia que incluyen propagación de células filamentosas e hiperplasia celular, vacuolas en los hepatocitos, o picnosis nuclear en hígado y riñón, aumento del espacio de Bowman y acrecentamiento de gotas hialinas en células del epitelio tubular de la tilapia, modificación de la actividad sexual y de enzimas hepáticas en peces, alteración en el metabolismo, de células sanguíneas y fisiología de algunos órganos que constituyen tejidos como lípidos totales, glucosa, y otros metabolitos. Las variaciones dependen de la especie, clase de sustancia, concentración del herbicida en agua y tiempo en que se expone [40].

Glifosato en suelo

El herbicida glifosato es de carácter sistemático, se toma por las hojas y luego se traslada por toda la estructura vegetal usando el floema hasta los núcleos metabólicos (meristemas y raíces) [41] en lo cual influye los entornos del suelo, cantidad de fosfatos [42], total de hierro utilizable para el cultivo, el pH, capacidad de intercambio catiónico, la presencia de arena y materia



orgánica del suelo que pueden cuantificarse, estos elementos instauran la absorción a la que puede llegar el glifosato, además la toxicidad en el suelo depende de la translocación del herbicida desde el tejido de raíz hacia el suelo, aumenta la permanencia de dos a seis veces [42].

Glifosato en aire

Cuando se analiza el comportamiento del glifosato en el aire se encuentra que se debe al transporte posteriormente de la aplicación en un periodo. La presencia de surfactantes y aceite mineral en la formulación aporta mayor peso a las gotas de glifosato rociadas para evitar en lo que más se pueda el efecto deriva, o desviación del riego por corrientes de aire [38]. El material volátil en el la post-aplicación no es causa suficiente de contaminación, ya que la presión de vapor aproximadamente esta entre 1.84×10^{-7} mmHg, (45°C) y 5.0×10^{-5} mmHg (25°C) [43]. La presión de vapor del herbicida es baja, es un líquido que no cambia a la fase vapor sencillamente [38]

Glifosato en alimentos

El glifosato se puede encontrar como trazas cuando es captado totalmente por el vegetal, y esto puede darse por la aspersión del herbicida para aquellos utilizaciones autorizadas, ejemplo en maíz, trigo, soya, frutas y hortalizas), además de la contaminación indirecta de vegetaciones circundantes a estos cultivos [44].

RUTAS METABÓLICAS DE DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO POR MICRORGANISMOS

Con respecto a las vías de degradación de glifosato por microorganismos, están propuestas tres rutas como se observa en la Figura 6.

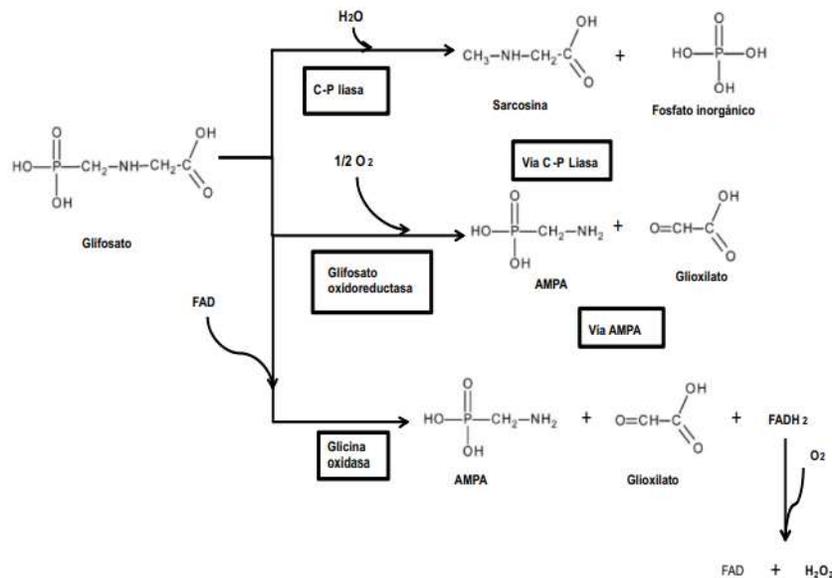


Figura 6. Vías de degradación del glifosato [45].

La primera vía de degradación de este herbicida es la conversión del glifosato a concentraciones estequiométricas de AMPA y glioxilato a través de la escisión del enlace C-N por la enzima glifosato oxirreductasa (GOX). El glifosato, ingresa al ciclo del ácido tricarboxílico como un sustrato de energía conveniente para la mayoría de las bacterias. A su vez, en esta misma ruta, se proponen tres vías relacionadas al AMPA: (i) el AMPA se libera al medio ambiente teniendo una toxicidad potencial, (ii) AMPA se metaboliza a metilamina y fosfato catalizado por CP liasa, (iii) una vía de fosfatasa, es decir, el AMPA se metaboliza primero a fosfonoformaldehído por una transaminasa y luego se transforma en fosfato y formaldehído para su posterior metabolismo por la fosfatasa. Esta última vía indicada, tercera del AMPA, es experimental ya que no se ha logrado aislar las enzimas para ser caracterizadas [46].

La segunda vía de degradación es la metabolización del glifosato a fosfato y sarcosina a través de la escisión directa del enlace C-P catalizada por la enzima CP liasa [47]. El fosfato puede ser metabolizado aún más por otras especies microbianas incapaces de romper el enlace C-P del



glifosato. La sarcosina, se puede utilizar como nutriente de crecimiento siendo fuente de carbono y nitrógeno para microorganismos, y se metaboliza aún más a glicina y formaldehído por la sarcosina-oxidasa [48]. La glicina se metaboliza con mayor frecuencia por microorganismos, y el formaldehído ingresa a la vía de tetrahidrofolato de transferencias de un solo carbono para generar CO_2 y NH^{4+} [49].

Otra vía de degradación fue observada en *Acromobacter sp.* que utilizó glifosato como única fuente de fósforo, lo que resultó en la producción de acetilglifosato [46]. El papel fisiológico de esta vía sigue siendo desconocido, además el acetilglifosato no puede ser utilizado por *Acromobacter* Kg¹⁶ como fuente de fósforo, lo que provoca su escaso crecimiento. Aunque la biodegradación del glifosato por esta ruta se ha estudiado considerablemente, aún no se conoce con precisión el mecanismo [46].

POSIBLES AFECTACIONES DEL GLIFOSATO

Con respecto al glifosato, desde su uso convencional hasta su uso indiscriminado, se han documentado algunas posibles afectaciones. En temas ambientales, en el suelo el glifosato es fácilmente absorbido por las hojas y acarreado a través del vegetal hasta alcanzar a las raíces. Los fundamentos sobre cambio y adherencia en el suelo aún son discordantes. Para la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos, el suelo captura fuertemente las partículas del herbicida inclusive en aquellos con poca materia orgánica y baja granulometría. En este sentido, no obstante el glifosato es crecidamente soluble, puede ser parcialmente inmóvil, permaneciendo en el horizonte superior y sin lixiviación. En el aire las partículas del glifosato están asociadas al



transporte, lo anterior debido a tensoactivos y ácidos minerales. No se ha reportado una contaminación específica del aire, ya que la saturación de vapor tiene unos valores determinados (1.84×10^{-7} mmHg a 45°C y 5.0×10^{-5} mmHg a 25°C) causando que el glifosato sea una sustancia líquida primordialmente [50]. Además, estudios corroboran la hipótesis de que el glifosato en dosis superiores a 360 g c/ha^{-1} daña cítricos a largo plazo, por su contacto directo en las alteraciones de la vía shikimato y los procesos de fotosíntesis, aun cuando la fitointoxicación no sea visible [51].

En cuerpos de agua, un estudio encontró que el glifosato mostraba diferentes niveles de fotodegradación con una lámpara de xenón de 500 watos, con liberación de fosfato cuando ingresaba al ambiente acuático. La principal fuerza impulsora de la fotodegradación del glifosato es el OH generado por la materia orgánica disuelta (DOM) y nitritos. Además AMPA y fosfato, los productos de fotodegradación del glifosato, podrían estimular significativamente el crecimiento de algas planctónicas, un factor de riesgo potencial para la contaminación del ambiente acuático [52].

Por último, en afectación al ser humano, los residuos de glifosato se encuentran con continuidad en la cadena alimentaria, cuando los productos alimenticios son rociados; se ha reportado que estos residuos se pueden detectar en orina humana a niveles de alrededor de $1 - 10 \mu\text{g/L}$ [53].

EL GÉNERO *Pseudomonas* sp.



El género *Pseudomonas* fue descrito por Mingula en 1984, de acuerdo a las características morfológicas de sus miembros. Durante años este género comprendió muchas especies que no siempre estaban bien caracterizadas. El trabajo de Stanier estableció como variables las características fisiológicas y bioquímicas para establecer la base taxonómica. En 1984, se revisó el género y se implementó una subdivisión de cinco grupos sobre la base de los resultados de la hibridación ADN-ADN y de ARNr-ADN [54]. Bajo la siguiente consideración el género de *Pseudomonas sp.* es uno de los más complejos, con 117 especies reconocidas [55], y se describen nuevas continuamente. Son bacilos Gram negativos, generalmente móviles, pueden usar el oxígeno y el nitrato (en menor medida) como aceptores de electrones [56]. El género, tiene gran variedad metabólica y consiguientemente son idóneos para colonizar un extenso rango de ambientes. Se han separado *Pseudomonas sp.* desde suelos no contaminados y contaminados por moléculas de origen biológico y xenobióticos. *Pseudomonas sp.* es parte de la microflora en rizosfera y filoplano, habitan entornos acuáticos, y existen especies que son patógenos de seres humanos (*P. aeruginosa*) o plantas (*P. syringae*) [56]. El extenso potencial en rutas metabólicas en este tipo de bacterias se da por la presencia de plásmidos y transposones. Desde el punto de vista de uso como antimicrobiano, *Pseudomonas sp.* tiene la capacidad de secretar fenazinas, 2,4-diacetilfloroglucinol, pioluteorina, pirrolnitrina, lipopeptidos y cianuro de hidrogeno [20]. Se han referido cepas competentes de soportar metales pesados, disolventes orgánicos y desinfectantes, es cierto que consiguen usar muchas fuentes de carbono [57]. El género *Pseudomonas sp.* tiene roles recalcados en reciclaje de materia orgánica en los entornos que habita. Esta clase de organismos tiene uso en biodegradación, se utilizan en distintos procesos industriales, incluyendo elaboración de biopolímeros y control de patógenos [58].



LA BACTERIA *Pseudomonas extremaustralis*

P. extremaustralis fue descubierta en la península Antártica, no es una especie que cause enfermedades, tiene una alta tolerancia al frío extremo, es un organismo de metabolismo oxidativo, sintetiza polihidroxibutirato (PHB) que lo usa para su desarrollo y supervivencia [19], la bacteria puede crecer y formar biopelículas a bajas temperaturas sobreviviendo en congelación [59], su metabolismo es no fermentativo, sus colonias son circulares, lisas y no pigmentadas. Este género se caracteriza por su diversidad metabólica y el uso de pocos componentes nutricionales, además de poder usar compuestos orgánicos como única fuente de carbono (C) y energía. Su adaptabilidad para la colonización y supervivencia se encuentran relacionadas con las diferentes vías metabólicas, teniendo en cuenta las condiciones ambientales naturales, entre las que podemos citar la disponibilidad de oxígeno, nutrientes, sales y temperatura [60]. En comparación con otras especies del género *Pseudomonas*, como *P. putida*, *P. aeruginosa* y *P. protegens*, *P. extremaustralis* crece más rápido y alcanza mayores rendimientos de biomasa a bajas temperaturas, además su metabolismo en condiciones de frío se han estudiado en experimentos de RNA-seq, describiendo un papel esencial de oxidación del etanol [61]. *P. extremaustralis* es capaz de reducir nitratos a nitritos, realizar fermentación de arginina y piruvato [62], asimismo es capaz de soportar y degradar hidrocarburos lo que facilita su uso en situaciones ambientales extremas para su biorremediación, al crecer en condiciones microaerófilas y formar biopelículas, presenta la capacidad para degradar cadenas largas de alcanos superiores a C₁₂ [63], las rutas metabólicas responsables de la supervivencia bajo condiciones desfavorables son el acetato de quinasa (pirúvica y fermentación ácida), genes que codifican el transportador de potasio, y la biosíntesis del ácido colánico que son relevantes para



la resistencia osmótica al adquirirse a través de movimientos horizontales y transferencias de eventos [60].

En un estudio desarrollado del genoma de *P. extremaustralis*, se ha encontrado un sistema de defensa antioxidante bien desarrollado que incluye cinco catalasas, una superóxido dismutasa, un citocromo c551 peroxidasa reductasa, siendo la cepa capaz de utilizar nitrato como aceptor de electrones alternativos [64]; en concordancia entre sus genomas se encontró que tenía 18 genes relacionados con el metabolismo del nitrato, entre los que se encuentran el óxido nítrico y nitroso [65], de igual manera se logró determinar que genes podrían permitir a *P. extremaustralis* hacer frente a compuestos tóxicos como metales pesados (copRSABCD, czcABCD y znuABC) al igual que el arsénico (asrRBC) y el gen que codifica la proteína resistente al arsénico (ACR3) así como vías de degradación del fenol y alcano (dmpKLMNOP y alkB) respectivamente [65].

Otro aspecto que se logró evaluar para este género fue un estudio que informa sobre el aislamiento a partir de lodos de depuradora producido en plantas de tratamiento de aguas residuales, de cepas bacterianas capaces de degradar el paracetamol, donde se logró separar hasta 17 cepas bacterianas, pero sólo dos de ellas identificadas como *P. stutzeri* CSW02 y *P. extremaustralis* CSW01 fueron capaces de degradar concentraciones muy elevadas de paracetamol en solución como única fuente de carbono y energía, y ninguna de estas había sido previamente identificadas como degradadoras de esta molécula. Estas bacterias mostraron la capacidad de degradar hasta 500 mg L⁻¹ de paracetamol en cuatro horas (*P. stutzeri* CSW02) y seis horas (*P. extremaustralis* CSW01), mucho más rápido que cualquier otra cepa degradadora de este medicamento. Estos hallazgos indican que ambas bacterias son candidatas para su uso en



la biorremediación de paracetamol en agua y lodos [66]. De igual manera cuenta con unos resultados favorables al crecer bajo condiciones microaerófilas utilizando combustible diésel como única fuente de carbono, consumiendo $15,95 \pm 2,97\%$ de combustible diésel, proporcionando evidencia de la activación de la vía de degradación de alcanos en condiciones microaerófilas, independiente de la presencia de hidrocarburos ambientales en una bacteria aislada. Este metabolismo representa una ventaja adaptativa en un entorno cambiante al apoyar la supervivencia en condiciones de bajo oxígeno como los encontrados con petróleo [59].

P.extremaustralis es una bacteria psicotolerante, que presenta un mejor comportamiento en condiciones frías que otras especies de *Pseudomonas*, y constituyen un modelo para encontrar mecanismos del desarrollo bacteriano a bajas temperaturas. [61] [60] [67]

BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación implica métodos, equipos y similares, y procedimientos que modifican la constitución de una sustancia dañina para salud o ambiente, con tratamientos fisicoquímicos, donde la primera etapa necesita caracterizar la molécula o compuestos, y remediación con microbios que alteran el compuesto en uno menos tóxico con enzimas [68]; otro acercamiento es la bioestimulación donde se utilizan condiciones fisiológicas controlada que favorecen el desarrollo del microorganismo autóctono responsable del efecto, y en la bioaumentación hay un enfoque sobre un microorganismo específico aislado y evaluado con anterioridad para el efecto sobre la sustancia tóxica [69]. Los métodos de biorremediación convierten las sustancias tóxicas en sustancias inocuas, y se originan moléculas inorgánicas como agua, dióxido de carbono



(CO₂), amonio (NH⁴⁺), dióxido de azufre (SO₂), o nitrato (NO₃), entre otros, a lo cual se le llama biomineralización [70].

Entre los microorganismos usados en degradación de xenobióticos recalcitrantes esta *Flavobacterium sp.* que mostró capacidad de degradar 95% de diazinón y 51% de paratión [71], *Sphingomomas sp.* que a las 72 horas se observó 100% de degradación del plaguicida Dicamba [72], *Streptomyces sp.* es ejemplo de degradador del 77% del químico DDT en siete días [73], *Inaquosorum sp.* que remueve el 90% de pendimetalina [74], *Bacillus safensis* y *B. cereus* degradan 70% de endosulfan [75], *Acinetobacter sp.* presentó capacidad de utilizar el plaguicida clorpirifos, este organofosforado representa la fuente de carbono [76], inclusive tiene el potencial de resistir distintas sales y metales pesados (arsenito, arseniato, cadmio, cromo, cobre, plomo, níquel y zinc) [77], varios representantes del género *Pseudomonas* pueden remediar el 46.5% del producto químico imidacloprid, y 96.6% de endosulfan [78].

Remediación del Glifosato

La biodegradación de compuestos orgánicos es conocida como un método eficiente y ecológico para eliminar los contaminantes orgánicos del medio ambiente acuoso [79]. Los géneros bacterianos más comúnmente aislados para la biodegradación del glifosato son las *Pseudomonas sp.* [80]. La mayoría de las especies reportadas usan glifosato como la ideal fuente de fósforo, pocas excepciones lo utilizan como fuente de nitrógeno o carbono. Los microorganismos se cultivan en medios libres de carbono, nitrógeno y fosfato que contienen este herbicida. La inducción del sistema de enzimas metabólicas de glifosato aumenta su eficiencia de utilización de glifosato. Por lo que el glifosato sirve como mejor fuente de fósforo para los microorganismos que como fuente de carbono. En la degradación microbiana del glifosato, una de las vías es la

que se realiza este proceso es sobre el enlace carbono-nitrógeno, el cual es roto por la enzima glifosato-oxidoreductasa generando AMPA y glioxilato que será consumido para obtención de energía por la mayoría de microorganismos, teniendo como resultado que el AMPA no se pueda metabolizar en la células vegetales en el entorno natural, siendo un daño potencial para el medio ambiente en una contaminación secundaria [81].

PATENTE

La Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (World International Property Organization - WIPO) es un cuerpo de la Naciones Unidas que está compuesto por 193 estados asociados. Tiene como gestión liderar las decisiones en el impulso de un Sistema Internacional de Propiedad Intelectual imparcial y eficaz, reconociendo la innovación y la creación en favor de la humanidad. La WIPO precisa el concepto de patente al “*derecho exclusivo que se concede sobre una inversión*”, en un contexto habitual la patente permite a su propietario decidir si la invención puede ser explotada por terceros, y la manera. Como compensación de este derecho, en el instrumento de patente publicado, el propietario de la patente coloca a disposición de la sociedad la totalidad de los datos técnicos asociados a la invención [82].

El propietario de la patente posee el derecho de exclusividad, y puede imposibilitar que la invención objeto de la patente sea utilizada comercialmente por otras partes, de esta forma no es posible producir, emplear, comerciar, con fines lucrativos, tampoco se puede vender sin el anuencia del propietario. La vigencia de una patente es local, ya que la exclusividad tiene rigor en la nación donde se presentó la solicitud, todo bajo la normatividad de dicha región. Este

resguardo se otorga por un espacio limitado de tiempo de 20 años, que se cuentan desde la fecha de introducción de la solicitud [83].

Obtención de una patente

El primer paso es realizar solicitud de patentamiento ante la oficina nacional o regional de propiedad Intelectual (PI) autorizada. Si se espera lograr resguardo en distintas naciones se ejecuta la solicitud en virtud del Tratado en Materia de Cooperación de Patentes (PCT) [84].

Condiciones

Para alcanzar una patente deben satisfacer muchos requisitos, aquí se procede a destacar los más trascendentales, aunque hay varias regulaciones país específicas: (i) Elemento de novedad, debe presentar una cualidad nueva que no esté en el campo de conocimiento anteriormente a la solicitud, se designa “Estado de la Técnica”; (ii) Actividad inventiva que no logre ser teorizada de modo evidente por alguien experto en el sector específico; (iii) Aplicación industrial, se espera que tenga aplicación práctica en industria o similar, que no se constituya en un razonamiento teórico, y componer un beneficio; (iv) Material patentable, no se considera objeto de patente las teorías científicas, creaciones estéticas, métodos matemáticos, variedades vegetales o animales (naturales), métodos comerciales o de tratamiento médico, software); (iv) Divulgación que debe ser completa para acceder a su reproducción en el sector. Las reclamaciones o reivindicaciones corresponden a la descripción [85].

Costos

El coste de una patente depende del país, incluyendo algunos componentes como la naturaleza, complejidad, remuneración legal, extensión de la solicitud e impugnaciones que se sabrían plantear durante el análisis de la oficina de patentes. Es significativo tener en consideración los costos de sostenimiento o de renovación, lo cual sucede una vez al año, para conservar la validez de la patente, los precios de traducción y los salarios de los funcionarios de patentes específicos, el solicitante debe comprobar si hay reducciones de costos a pequeñas o medianas compañías, o quienes exhiben la solicitud vía web, situaciones que pueden llevar a que los valores económicos de mantenimiento crezcan [86].

Redacción de una solicitud de patente

La solicitud de una patente está formada por: (i) Petición, el solicitante expone que quiere proteger, proporcionando título de la patente, fecha de introducción de la solicitud, momento de prioridad, referencias documentales, dirección de contacto; (ii) Delineación clara y de detalle que indique a que aplicación industrial concierne la solicitud, historiales y descripción de la patente; (iii) Diseños, planos o esquemas que deben ofrecer datos de la invención; (iv) Reivindicaciones que definen de forma clara y sucinta el terreno de protección; (v) Sinopsis que se fundamenta en destacar las características principales de la patente [87].

Proceso de patentamiento

Cuando se ha realizado la solicitud de una patente, esta será gestionada acorde a las leyes nacionales o regional, involucrando los consiguientes factores (Figura 7): (i) Análisis de forma, certificando que tiene los documentos y procesos administrativos; (ii) Investigación del estado de la técnica, para establecer la posibilidad de proteger la invención esencia de las reivindicaciones; (iii) Indagación de fondo que avala que la solicitud tenga las circunstancias de patentabilidad

(materia patentable, novedad, actividad inventiva, aplicación industrial y divulgación suficiente); (iv) Comunicación del resultado del análisis que se remite al solicitante para enmendar las observaciones trazadas; (v) Divulgación que en la mayoría de estados se pública 18 meses después de la fecha de prioridad; (v) Autorización y divulgación, si el análisis es aprobado, la oficina de patentes otorga el derecho de patentabilidad; (vi) Modo de oposición, espacio de tiempo concedido para que terceras partes puedan demostrar impugnaciones [88].

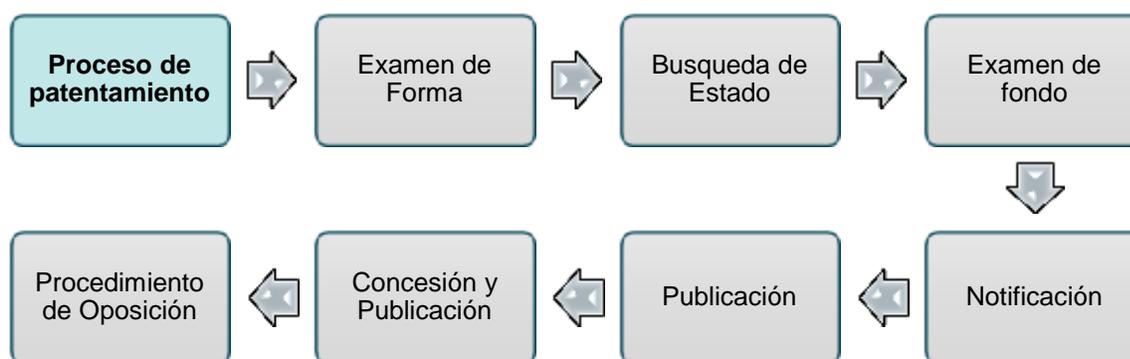


Figura 7. Proceso general para obtener una patente. Los tiempos de cada gestión son variables y existen costos asociados dependiendo de la jurisdicción.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar *in silico* la capacidad de degradación de glifosato por *Pseudomonas extremaustralis*.

Objetivos Específicos

- Realizar análisis de patentes relacionadas con la degradación de glifosato por bacterias.
- Determinar *in silico* rutas metabólicas y enzimas implicadas en la degradación de glifosato por *Pseudomonas extremaustralis*.
- Identificar *in silico* propiedades de proteínas relacionadas con la degradación de glifosato en *Pseudomonas extremaustralis*.



METODOLOGÍA

ESTUDIO DE PATENTES RELACIONADO CON DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO POR BACTERIAS

Para el análisis de patentes asociado con degradación de glifosato por bacterias se manipularon los motores de búsqueda de Google Patents (<https://patents.google.com/>), World Intellectual Property Organization - WIPO (<https://www.wipo.int/patents/es/>) y Superintendencia de Industria y Comercio (<https://www.sic.gov.co/patentes>), que indexan patentes y solicitudes de patentes, usando las palabras claves: glifosato, bacteria y degradación (glyphosate, bacteria, degradation).

IDENTIFICACIÓN *in silico* DE ENZIMAS ASOCIADAS A DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO EN *Pseudomonas extremaustralis*

Para análisis de parámetros asociados (enzimas) en la degradación de glifosato se utilizaron las siguientes bases de datos: Metacyc (<https://metacyc.org/>) y Swiss-Prot (<https://www.expasy.org/resources/uniprotkb-swiss-prot>). Desde Metacyc se identificaron las rutas y enzimas teóricas asociadas a la degradación de glifosato usando las palabras clave “glyphosate” y “degradation”, y con la información obtenida de rutas y enzimas implicadas se procedió a utilizar Swiss-Prot para encontrar las secuencias de aminoácidos de dichas enzimas para remediación de este herbicida, debido que esta base de datos es curada, teniendo en cuenta como parámetros de selección para un resultado el valor E (más cercano a 0.0), porcentaje de identidad (mayor a 40%) y porcentaje de cobertura (mayor de 70%). Posteriormente estas secuencias se utilizaron para la determinación de la presencia de enzimas relacionadas en el



genoma de *P. extremaustralis* cepa 2E-UNGS (tax id 359110) presente en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) haciendo uso de la herramienta tBLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

CARACTERIZACIÓN *in silico* DE ENZIMAS RELACIONADAS CON DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO EN *Pseudomonas extremaustralis*

La caracterización bioquímica de las proteínas relacionadas con la degradación de glifosato identificadas en el genoma de *P. extremaustralis* 2E-UNGS se realizó con herramientas de Bioinformática que incluye Protparam del servidor Expasy (<https://www.expasy.org/resources/protparam>) para los siguientes parámetros: peso molecular (Daltons - Da), punto isoeléctrico (pI), residuos cargados negativamente (glutamina - Glu y aspartato - Asp), residuos cargados positivamente (lisinas - Lys y Arginina -Arg), índice de inestabilidad, índice alifático, hidropaticidad e índice GRAVY, y para establecer diferencias estadísticas entre las secuencias estudiadas se utilizó la prueba de t de student ($p < 0.05$). Se realizó comparación de las secuencias por tipo de aminoácido con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Los parámetros de hidrofobicidad, flexibilidad y residuos accesibles se generaron utilizando ProtScale (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pI>). La identificación de residuos antigénicos se realizó con EMBOSS Antigenic (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic>).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESTUDIO DE PATENTES RELACIONADAS CON DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO POR BACTERIAS

Para establecer las características de las patentes asociadas con degradación de glifosato por bacterias se utilizó la base de datos de patentes Google patents (<https://patents.google.com/>), el cual es un servicio de búsqueda de patentes creado en el año 2006 que acumula aproximadamente más de 87 millones de patentes de las siguientes oficinas:

- United States Patent and Trademark Office (USPTO),
- European Patent Office (EPO),
- China's National Intellectual Property Administration (CNIPA),
- Japan Patent Office (JPO),
- Korean Intellectual Property Office (KIPO),
- World Intellectual Property Organization (WIPO),
- Deutsches Patent- und Markenamt (DPMA),
- Canadian Intellectual Property Office (CIPO),
- Rospatent (Rusia),
- Intellectual Property Office (Reino Unido),
- National Institute of Industrial Property (Francia),
- Oficina de patentes de Países Bajos.
- Oficinas de España, Belgica, Dinamarca, Finlandia y Luxemburgo

En Google patents se encuentra solicitudes, referencias, reclamaciones, planos, gráficos y dibujos. Para la búsqueda en esta base de datos se utilizó palabras claves “glyphosate”, “bacterium”, “degradation”, obteniendo como resultado 60803 patentes. Para generar un filtrado de los resultados más relevantes se usó la siguiente fórmula de búsqueda: AB=(glyphosate-



bacterium-degradation), con lo cual se lograron 28 resultados que se verificaron de manera manual, seleccionando 15 patentes directamente asociadas. En la Tabla 1 enseña la información de título, país, fecha de solicitud, estado, prioridad de aplicación, código, propietario, aplicación por PCT, familia de patentes, elemento, enlace, resumen, y en la Tabla 2 se presentan las reivindicaciones correspondientes.

Tabla 1. Información de patentes asociadas a degradación de glifosato por bacterias.

Título	País	Fecha de solicitud	Estado	Prioridad de aplicación	Propietario	Código	Aplicación por PCT	Familia de patentes
A kind of method that employing microbial degradation glyphosate is used for heavy metal ion mineralising	China	2017-03-15	Activo (Vence 07/07/2035)	CN201510393343.3A	Southeast University	CN104998899B	CN201510393343.3A	WO1992019719A1; CN102757896A
Nitrogen-fixing Klebsiella sp. with high anti-glyphosate activity and its application	China	2012-02-10	Pendiente	CN2012100298276A	INSTITUTE OF MICROBIOLOGY GUANGXI ZHUANG AUTONOMOUS ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES	CN102965296A	CN2012100298276A	CN103911317A; CN104351255A; CN105063166A; CN105754901A; CN106962115A; CN108728386; CN112189565A
Resistance gene capable of degrading herbicide glyphosate and encoded protein of resistance gene	China	2014-12-31	Caducada	CN2013103204129A	Huazhong Agricultural University	CN103421824A	CN2013103204129A	CN101484463A
Method for screening aquatic corynebacteria and application thereof in degradation of waste water of glyphosate	China	2011-08-24	Caducada	CN200910272949A	Three Gorges University	CN200910272949A	CN101709284A	CN200910272949A
Ochrobactrum intermedium26B and application thereof	China	2022-04-29	Activa 08/04/2040	CN202010270243.2A	South China Agricultural University	CN111560326A	CN202010270243.2A	CN202010270243.2A
Chryseobacterium and application thereof in degrading glyphosate	China	2022-09-06	Activa 08/11/2041	CN202111314728.8A	South China Agricultural University	CN114196570A	CN202111314728.8A	CA2993188A1; CN111560326A
Characteristics of glyphosate degrading bacteria	China	2020-06-19	Pendiente	CN201911095758.7A	University of Chinese Academy of Sciences	CN111304109A	CN201911095758.7A	CN201911095758.7A
Process for microbial removal of phosphono- bzw. phosphinoverbindungen	República Democrática de Alemania	1989-01-12	No Reporta	DD32500489A	Werner LerbsRosemarie WeidhaseBirgit SlamaDieter JankeBenno ParthierReinhard Weidhase	DD279498A1	DD32500489A	EP0465452A1
Glyphosate degrading bacteria and application thereof	China	2021-12-17	Activa 2041/10/08	CN202111168018.9A	Shandong Feed Veterinary Drug Quality Inspection Center Shandong Yisheng Livestock & Poultry Breeding Co Ltd	CN113604411B	No reporta	CN1062265A; WO1992019719A1; CN103911317A
Glyphosate degrading bacteria	French	1992-11-12	No Reporta	GB919109690A	Rosemary Elaine DickJohn QuinnSarah Bronwen ReesWolfgang Walter Schuch	WO1992019719A1	PCT/GB1992/000773	WO1992000377A1
Method for degrading glyphosate pesticide by using lactobacillus alkaline phosphatase	China	2021-03-19	Pendiente	CN202110330417.4A	Northeast Agricultural University	CN113058194A	CN202110330417.4A	CN105219753A; CN105602872A; CN106755006A; CN110272880A
Human ochrobactrum anthropi for efficiently degrading glyphosate and application thereof	China	2022-05-10	Activa 2042-05-10	CN202210504379.4A	South China Agricultural University	CN114717159A	CN202210504379.4A	CN102108363A; CN103290036A; WO2017128301A1
Paenibacillus polymyxa capable of degrading glyphosate and application thereof	China	2023-07-21	Pendiente	CN202310896458.9A	FUJIAN NANPING AGRICULTURAL SCIENCE INSTITUTE	CN116676237A	CN202310896458.9A	CN202310896458.9A
The pseudomonas and its application of organophosphorus pesticide and nitrate in low temperature underground water are removed simultaneously	China	2019-01-25	Pendiente	CN201910073209.3A	HEILONGJIANG UNIVERSITY	CN109706099A	CN201910073209.3A	CN109722396A; CN110591979A; CN112760266A
Method for preparing glyphosate solid pesticide-degrading bacterium	China	2018-01-11	No reporta	201810657630.4	JINGMEN TUODA TECHNOLOGY.CO.LTDA	CN108728386	CN108728386	No registra

Tabla 2. Reivindicaciones de patentes bajo el tema de degradación de glifosato por bacterias..

Código	Reivindicaciones
CN104998899B	Método: Preparación bacillus subtilis y colloid bacillus cereus, mediante siembra de cultivo en solución de talina; posterior a la concentración de los compuestos, se agrega una solución bacteriana que contiene glifosato, la solución de metales pesados se agita. El efecto de degradación de los bacillus produce radicales fosfatos en una pequeña molécula en presencia de una degradación rápida ya sea dióxido de carbono y agua; se deja reposar entre 4-5 horas, realizar el lavado completo para precipitar, filtrar, secar y obtener fosfato mineral y clorhidrato de carbono.
CN102965296A	Es una cepa de Klebsiella de nitrógeno fijada de actividad altamente resistente al glifosato; esto a que la cepa bacteriana denominada GG08160 tiene la actividad de glifosato de alta resistencia y puede promover significativamente el crecimiento de las plántulas de caña de azúcar con la fijación de nitrógeno por asociación de la caña de azúcar.
CN103421824A	La intervención se relaciona con la separación in vitro e identificación funcional de un gen resistente capaz de degradar eficientemente el herbicida glifosato. De acuerdo al estudio la glicina oxidasa (thiO) de la bacteria marina bacillus cereus se realiza mutagénesis aleatoria y una ronda de prueba de mezcla de forma continua en la glicina oxidasa y se combinan con tecnología basada en acoplamiento de la enzima pirólisis del fago T7 -peroxidasa; demostrando la aplicación del gen en la degradación de la resistencia al herbicida glifosato. 1. El gen del glifosato oxidasa B 3S1 de una separación de una secuencia de 1110 pb. 2. En la secuencia de aminoácidos del glifosato oxidasa B3S1 que separa sus 369 aminoácidos. 3. La aplicación del gen, en plantas transgénica resistentes al glifosato. 4. La aplicación de proteínas codificadas en las plantas transgénicas de resistencia al glifosato.
CN200910272949A	Método: 1. Enriquecimiento de una cepa bacteriana. 2. Condiciones de la cepa bacteriana. 3. Purificación de la cepa bacteriana.
CN111560326A	1. El Ochrobactrum intermedium fue tomada de microorganismos de la provincia de Guangdong. 2. Describe la preparación de un inóculo microbiano degradante de glifosato. 3. Aplicaciones en la preparación del agente microbiano; en ecología en suelos o aguas contaminadas con glifosato y en el medio Ochrobactrum.
CN114196570A	1. Se toma una cepa Chryseobacterium sp Y16C se depositó en un cultivo de microorganismos de la provincia de Guangdong. 2. Se toma la cepa para degradar el glifosato 3. Se realiza la preparación de inóculo microbiano. 4. Se toma en cuenta para remediar un ambiente natural contaminado con herbicida glifosato. 5. El uso se utilizó en muestras de suelo y agua. 6. Se realiza preparación bacteria de herbicida glifosato que comprende Chryseobacterium Y16C en un líquido de fermentación. 7. El agente bacteriano degradante es 1,0 x 10 ⁵ -1,0 x 10 ⁹ UFC/ml 8. El agente bacteriano es el degradante; el material absorbente se usa para absorber Chryseobacterium y se prepara la forma sólida. 9. Un método para remediar un ambiente natural contaminado con glifosato, que comprende tratar ambiente natural con inóculo microbiano degradante.
CN111304109A	La cepa Bacillus cereus, una bacteria aeróbica capaz de degradar el glifosato caracterizada porque pueda tolerar un rango de concentración de 0-6 mol/L, teniendo buenas condiciones de crecimiento en un rango de valores de pH (5,0- 6,5) y tiene una tasa de degradación más alta (en valor máximo es de 77,7%) que el glifosato. 2. El crecimiento de la bacteria comprende una serie de gradientes de concentraciones. El método se caracteriza porque la concentración de glifosato en el medio de cultivo BPDA es de 0-6 mol/l. cuando la concentración del glifosato es superior a 6mol/L el crecimiento bacteriano se reduce. La concentración límite de glifosato para la supervivencia bacteriana fue de 10 mol/L. 3. El método, determina que las bacterias se cultivan en un rango de valores de pH (5,0-7,5) aumentando el crecimiento al aumentar el pH. Determinándose que la cantidad máxima de crecimiento de las bacterias a pH 5,5 indica que las bacterias son adecuadas para crecer en condiciones ligeramente ácidas. 4. Las bacterias tienen una tasa de degradación de glifosato en BPDA en un rango de valores de pH (5,0-7,0). 5. La identificación por secuencias genéticas de la especie de bacterias se caracterizó porque la secuenciación por 16S DNA incluyó extracción de ADN en cepa utilizando cebadores universales 16S, primer 27F y 1492R
DD279498A1	1. Un método para la degradación por microondas de compuestos fosfano o fosfina caracterizado porque las cepas Alcaligenes o Pseudomonas o sus variantes. 2. Procedimientos caracterizados al utilizan estos microorganismos como inóculo para cultivo que contiene fosfonato, ya que estos medios nutritivos contienen una fuente de carbono utilizable, sustancias activas y sales minerales. 3. Método caracterizado porque utiliza como inóculo toda la biomasa de un precultivo, donde le medio de fosfonato o necesita tener calidad de solución nutritiva, pero la capacidad metabólica de las bacterias debe mantener se durante el proceso. 4. El método, esta caracterizado porque se realiza el cultivo a un pH de -8; 7-7,5 de acuerdo a los procedimientos establecidos.
CN113604411B	1. Una bacteria degradante de glifosato de Pseudomonas sp SYH12 conservada en el Centro de colección de Cultivos en China. 2. El método para preparar un fungicida comprende los siguientes pasos: 1. Preparación de cultivo con los componentes de levadura de polvo, peptona, extracto de carne, Cloruro de sodio, sulfato de amonio, fosfato monopotásico, sulfato de magnesio, Cloruro de calcio, glucosa en un pH de 7,0 -7,2. 2 activación de cepas: cultivadas durante 24-48 h a 32°C. 3. Preparación de la semilla primaria: activación de la cepa en matraz triangular que contenga 50 ml de un medio de cultivo, sella y agitar a una temperatura entre 25-35 °C durante 24 a 48 horas en agitadora bajo 150- 200 r/min. 4. Expansión de la cepa: inoculación del 5-10 % en tanque fermentación de 5 litros bajo una velocidad de 200-700 r/min pH de 7,0-7,5 y temperatura 26-37 °C, cuando la concentración de la glucosa en modo fluido se mantiene, las células se recogen mediante centrifugación a 8000 r/min durante 10 minutos y las células se disuelven en agua clara isométrica para preparar suspensión bacteriana
WO1992019719A1	1. Un agente degradante de glifosato que comprende un microorganismo de la especie Alcaligenes que metaboliza el glifosato a través de la vía AMPA. 2. Un agente degradador de glifosato donde el microorganismo es Alcaligenes Xylosoxidans cepa SC9. 3. Un agente degradador de glifosato que metaboliza a través de la vía AMPA y que comprende una especie de Pseudomonas cepa SCI cuyo cultivo se encuentra en la colección nacional de bacterias Industriales y marinas del Reino Unido. 4. Un proceso de degradación de glifosato que comprende exponerlos a los agentes, proteínas o composiciones descritas en la investigación.
CN113058194A	1. Un método de degradación mediante el uso de fosfatasa alcalina de lactobacillus bajo los siguientes pasos: 1. Cultivar lactobacillus y obtener fosfatasa alcalina mediante trituración ultrasónica. 2. Detectar el residuo de glifosato mediante Cromatografía líquida de alta resolución. 3. Descubrir modos de acción del glifosato y ALP usando docking molecular, visualizando los sitios de unión similares. 4. Realizar diluciones bajo las concentraciones de 0,5 mg/, 1 mg/l, 2mg/l, 3 mg/l y 5 mg/l analizando el área de pico de la fase líquida.
CN114717159A	1. Se realiza el uso de una suspensión bacteriana para degradar glifosato. 2. Presenta método en donde se controla la temperatura de 20-40 C y un pH de 5,9.
CN116676237A	1. Una aplicación de Paenibacillus polymyxa capaz de degradar glifosato, que se caracteriza porque: uso del paenibacillus polymyxa NPDY05-8 según la reivindicación 1 para la preparación de una formulación degradante de glifosato, que comprende la etapa de aplicar el paenibacillus polymyxa NPDY05-8 a una planta o suelo, en donde paenibacillus polymyxa NPDY05-8 está presente en la planta o suelo junto con al menos una sustancia fuente de carbono existente para el crecimiento de paenibacillus polymyxa, en donde la sustancia fuente de carbono para el crecimiento de paenibacillus polymyxa es un tipo de sustancia fuente de carbono que puede ser utilizada por paenibacillus polymyxa y mantener el crecimiento de la cepa cuando se usa como sustancia fuente de carbono única. 2. El uso de Paenibacillus polymyxa capaz de degradar glifosato según la reivindicación 2: la concentración de glifosato en plantas o suelo es menor o igual a 800 mg/L. 3. Paenibacillus polymyxa capaz de degradar glifosato según la reivindicación 2: la sustancia fuente de carbono para el crecimiento de Paenibacillus polymyxa es cualquiera o una combinación de, carboximetilcelulosa sódica, glucosa, almidón, sacarosa, lactosa, L-arabinosa y D-xilosa. 4. Una aplicación de Paenibacillus polymyxa capaz de degradar glifosato, que se caracteriza porque: el uso de paenibacillus polymyxa NPDY05-8 de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de una formulación de control de enfermedades de cultivos, que comprende la etapa de aplicar dicho paenibacillus polymyxa NPDY05- 8 a plantas o suelo. 5. El uso de un Paenibacillus polymyxa capaz de degradar glifosato según la reivindicación 9, en el que: el Paenibacillus polymyxa NPDY05-8 se utiliza para degradar tres toxinas DON, NIV, ZEN producidas por fusarium.

CN 109706099A	1. Se selecciona como cepa bacteriana <i>Pseudomonas extremaustralis</i> Y39-6 depositada en el centro de microorganismos comunes del Comité de Colección de Cultivos de Microorganismos de China. 2. Las características de la temperatura de agua está entre los 6–10°C. 3. Los contaminantes son pesticidas organofosforados y nitrato. 4. Los resultados experimentales: después de 30 minutos entre 120 minutos que se degrada en agua subterránea, mide la tasa de reducción de nitrato y tiene una tasa de reducción de nitrato es de 43.54 ~90.21 mg/L/h. Para los herbicidas clopirifos, metil-paratión, rogor y glifosato la tasa de eliminación es de aproximadamente del 99%.
CN108728836	Las bacterias degradantes de pesticidas sólidos de glifosato se preparan produciendo carbón mediante la pirolisis de la cáscara de arroz y realizando un cocultivo con una cepa bacteriana de degradación de glifosato altamente eficiente. El método comprende los siguientes pasos 1. Activar el cultivo 2. Preparar carbón vegetal y un medio semisólido regulando el valor de pH y esterilizar. 3. Realizar una incubación en el medio semisólido, para obtener el producto objetivo. La bacteria degradante de pesticidas sólido, descrita por el método tiene las características de tener un bajo costo de producción y ser respetuosa con el medio ambiente, es capaz de degradar eficientemente los pesticidas de glifosato residuales en el suelo y tiene un excelente potencial en aspectos relacionados con la agricultura en suelo.

De las 15 patentes obtenidas se pueden evidenciar que China posee 13 patentes. La más antigua tuvo solicitud el 12 de enero del 1989, y la más reciente fue presentada el 21 de julio del 2023. Los años que tuvieron mayor cantidad patentes solicitadas fueron 2021 y 2022, dos patentes por año. Actualmente se encuentran cinco activas, dos caducadas, cinco pendientes y tres que no registran esta información. Adicionalmente se realizó una búsqueda adicional con los mismos términos en la base de datos de la Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia (<https://consultas2.oepm.es/InvenesWeb/faces/busquedaInternet.jsp;jsessionid=Gt4tLLgEEID9is i0AxyuVyP3.nodo2EAPConsultasPRO>), obteniendo nueve resultados: ES2389843 T3, ES2389843 T3, ES2406809 T3, ES2407857 T3, ES2488244 T3, ES2408244 T3, ES24335247 T3, ES2528914 T3, ES2612119 T3, ES2637948 T3, ES2843401 T3, de la entidad Dow Agrosiences LLC, las cuales protegen genes y proteínas, o métodos para prevenir el control de malezas.

De los resultados obtenidos se pueden destacar la patente “*Glyphosate degrading bacteria*”, bajo estado no reporta, código WO1992019719A1, la cual trata del aislamiento de nuevas cepas bacterianas SC9 (*Alcaligenes xylosoxidans* subespecies *denitrificans*) y SC11 (de una especie poco común de *Pseudomonas*) capaces de degradar el herbicida glifosato, esto a mención de que las bacterias son fuente de genes que codifican proteínas que degradan glifosato y que pueden utilizarse en la producción de plantas resistentes a herbicidas. En sus reivindicaciones describe el



método en suelo para la degradación de glifosato por *A. xylooxidans* subespecie *denitrificans* mediante la ruta del AMPA, esta degradación es aparentemente análoga al metabolismo bacteriano de los alquilos y arilfosfonatos que involucra la enzima C-P liasa para producir primero sarcosina, y luego glicina, con el carbono fosfonometil liberado del metabolismo [89].

Una segunda patente titulada “*The pseudomonad and its application of organophosphorus pesticide and nitrate in low temperature underground water are removed simultaneously*” de China, bajo el Código CN 109706099A con estatus de pendiente, trata sobre *Pseudomonas* y su aplicación para eliminar simultáneamente pesticidas organofosforados y nitrato en agua subterránea de baja temperatura. Se muestra el método para ser utilizada en matriz de agua subterránea simulada de 0.5 mg/L con una concentración de glifosato. Entre sus reivindicaciones se encuentra la aplicación de la cepa *P. extremaustralis* Y39-6, con características de temperatura de agua entre 6-10°C, para degradación de pesticidas organofosforados y nitrato. La patente describe que entre 30-120 minutos se mide la tasa de reducción de nitrato 43.54-90.21 mg/L h⁻¹, y para los herbicidas clopirifos, metil-paratión, rogor y glifosato dicha tasa es de aproximadamente 99% [90].

La patente titulada, “*Glyphosate degrading bacteria and application thereof*”, de China, bajo el código CN113604411B, trata sobre la bacteria degradadora de glifosato clasificada como *Pseudomonas sp* SYH12 bajo las características de alta velocidad de crecimiento, tolerancia al glifosato, alta estabilidad genética utilizada en cultivos y reparación del suelo. La identificación de la cepa está dada por análisis de 16SrRNA. La finalidad de la patente es presentar el esquema técnico de un método que comprende el paso continuo para la tolerancia al glifosato, con tasa de



degradación de 99,8% ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) hasta 58.9% (10 g L^{-1}), con posterior ejercicio realizado en campo con tasa de degradación superior al 68% a los 10 días después de la aspersión [91].

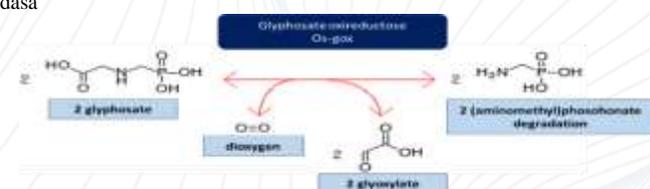
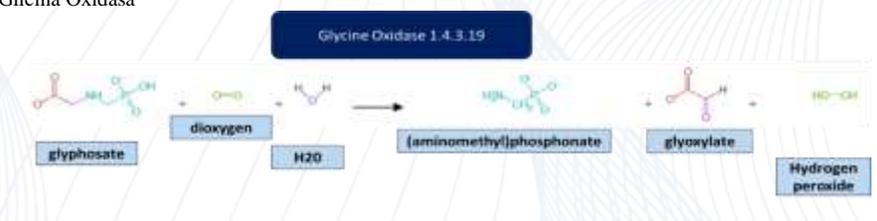
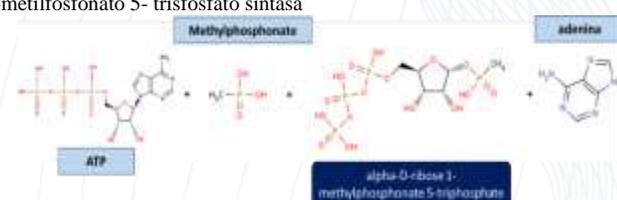
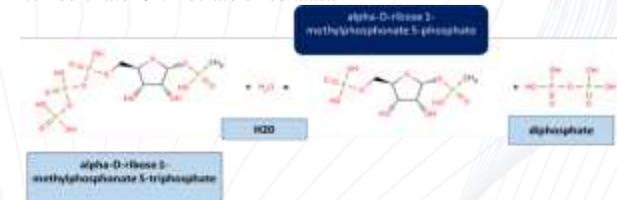
La investigación que reviste conocimientos científicos y técnicos que se desarrollan en el ámbito académico tiene una alta divulgación a la parte comercial, siendo crucial el aseguramiento de la propiedad intelectual. Para ello el uso de las patentes permite practicar la exclusividad en la elaboración y mercantilización de las iniciativas por un tiempo fijo, y en un área en específico. Es de esta manera que el registro de patentes, tanto para los investigadores o inventores, pueden generar capitalización, mejoramiento del prestigio o reputación, generando bienes con impacto social o comercial. Por otra parte, las universidades o centros de investigación pueden explotar la obtención de este tipo de derecho generando entradas económicas para estas instituciones e incentivando de esta manera el desarrollo de ciencia [92]. La importancia de los análisis de patentes en biotecnología se valora al determinar si se hace necesario el pago de derechos de autor, licenciamientos, o regalías, o hay libertad de usos de la patente porque esta caduca, esto evita infringir los derechos a terceros, aunque es de aclarar que las patentes cuentan con la cláusula bolar, la cual está definida como una excepción a los derechos de uso exclusivo conferidos, permitiendo la utilización de los productos patentados con fines experimentales, estudios o ensayos [93].

Con relación a los resultados obtenidos en nuestra investigación, se da claridad que no hay patente en Colombia que la investigación deba acogerse para el pago de derechos de autor; con relación a la identificadas en Google patents y WIPO, las cuales se describieron sus apartes más fundamentales. Esto es significativo porque evidencia que el uso de cepas de *P. extremaustralis*

como medio de degradación de glifosato cuenta con avances en desarrollo de método en laboratorio y campo experimental, y es de libre uso en Colombia para beneficios en el entorno ambiental.

DETERMINACIÓN *in silico* DE RUTAS METABÓLICAS Y ENZIMAS IMPLICADAS EN LA DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO POR *Pseudomonas extremaustralis*

La búsqueda en la base de datos MetaCyc, la cual contiene una amplia información sobre rutas metabólicas y enzimas mediante predicciones computacionales de rutas metabólicas de organismos a partir de sus genomas, presentó tres rutas para degradación de glifosato (Figura 8).

Ruta de degradación de glifosato I	<p>Enzima. Glifosato Oxidasa</p> 
Ruta de degradación de glifosato II	<p>Enzima. Glicina Oxidasa</p> 
Ruta de degradación III	<p>Enzima 1. α-D-ribosa-1-metilfosfonato 5- trisfosfato sintasa</p> 
	<p>Enzima 2. α-D-ribosa-1-metilfosfonato- 5-trifosfato difosfatasa</p> 
	<p>Enzima 3. α-D- ribosa-1-metilfosfonato 5-fosfato CP-liasa</p>

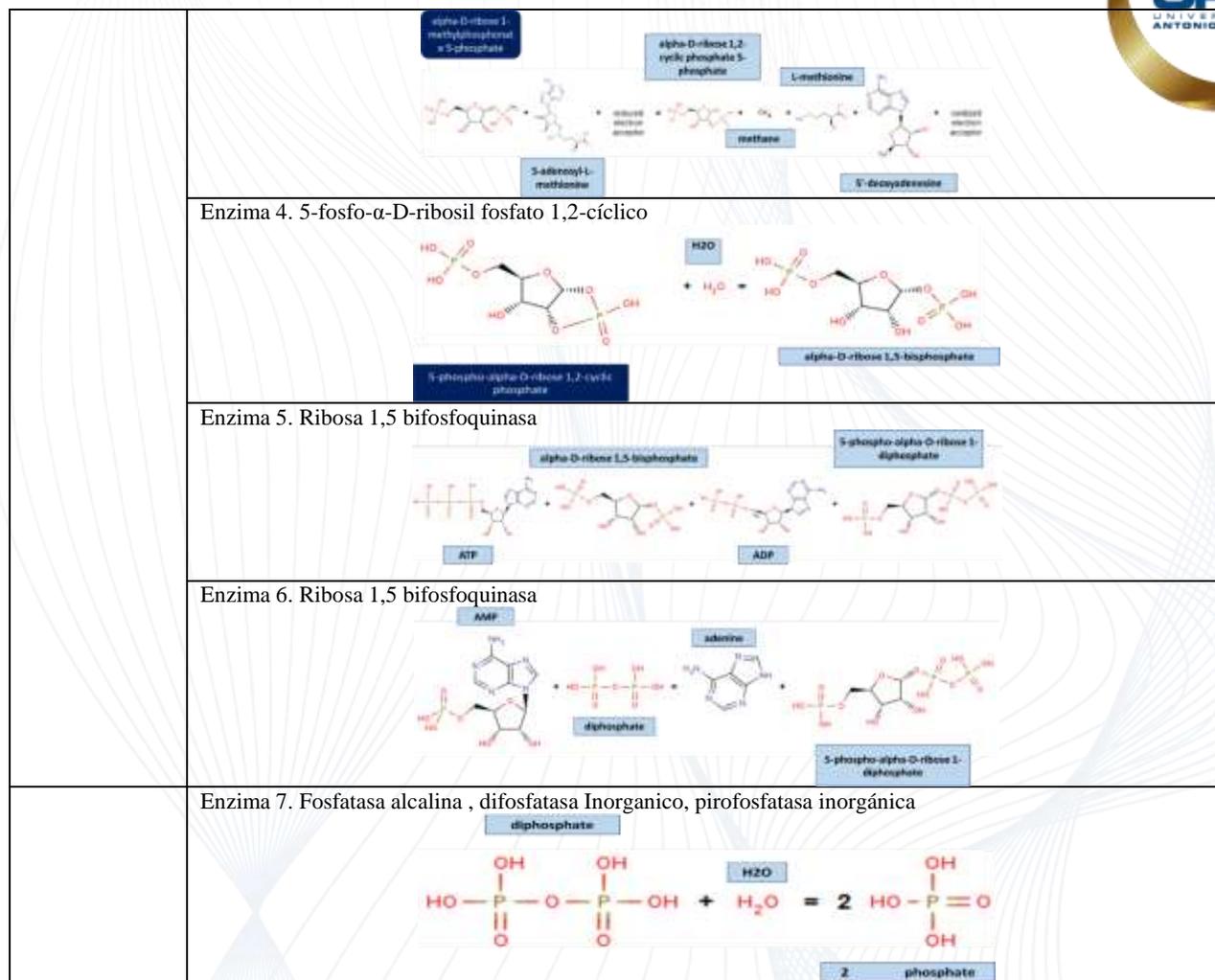


Figura 8. Rutas de degradación del glifosato y enzimas presentes en el proceso identificadas en la base de datos MetaCyc.

En la primera ruta interactúa la enzima glifosato oxidorreductasa (GOX), es una flavoproteína que emplea flavin adenina dinucleótido (FAD), esta enzima es capaz de romper el enlace C-N ocasionando como producto AMPA y glioxilato [94]. En la segunda ruta se encuentra la enzima glicina oxidasa del género *Bacillus sp.* la cual es una flavoenzima que consta de cuatro subunidades homologas, cada subunidad contiene una molécula FAD, unidad de forma no covalente [95]. Esta enzima cataliza la oxidación de la glicina en la biosíntesis del anillo de

tiamina tiazol produciendo α -cetoácido amoniaco/amina y peróxido de hidrogeno [96]. En la tercera ruta interactúan siete enzimas:

1. α -D-ribosa-1-metilfosfonato 5- trisfosfato sintasa, la cual es una enzima con nombre sistemático ATP: metilfosfonato 5-trifosforribosiltransferasa, a su vez esta enzima cataliza la reacción $ATP + \text{metilfosfonato} \xrightarrow{\quad} \alpha - D - \text{ribosa} 1 - \text{metilfosfonato} 5 - \text{trifosfato} + \text{adenina}$ [97], aislada de la bacteria *Escherichia coli*.
2. α -D-ribosa-1-metilfosfonato- 5-trifosfato difosfatasa
3. α -D- ribosa-1-metilfosfonato 5-fosfato CP -liasa, esta enzima radical es parte de complejo de CP liasa, que es responsable de procesar los fosfonatos en fosfatos utilizables [98].
4. 5-fosfo- α -D-ribosil fosfato 1,2-cíclico, es una fosfodiesterasa que desempeña un papel importante dentro de la liasa bacteriana de carbono-fósforo (CP-liasa) mediante el reciclaje de un intermedio “sin salida” 5-fosfo- α -D-ribosil fosfato 1,2-cíclico que se forma durante el catabolismo de organofosfonatos [99].
5. Ribosa 1,5 bifosfoquinasa
6. Ribosa 1,5 bifosfoquinasa
7. Fosfatasa alcalina, difosfatasa inorganico, pirofosfatasa inorgánica, es esencial para el crecimiento de todos los organismos conocidos, cataliza la escisión hidrolítica simple del pirofosfato en dos fosfatos. Esta reacción es esencial porque muchas reacciones biosintéticas clave liberan pirofosfatos a partir de trifosfatos de nucleótidos, y la hidrólisis posterior del pirofosfato hace que dichas reacciones sean funcionalmente irreversibles [100].

Realizado este proceso se determinan tres rutas metabólicas, nueve enzimas intervinientes:

- Enzima: GOX, organismo *Ochrobactrum sp*, código uniprot D2KI28 · D2KI28_9HYPH
- Enzima: Glycine Oxidase (ThiO)⁴, organismo *Bacillus subtilis*, código uniprot: O31616 · GLYOX_BACSU.
- Enzima: α -D-ribosa-1-metilfosfonato 5- trisfosfato sintasa, organismo *Rhizobium meliloti*, código uniprot Q52986 · PHNI_RHIME



- Enzima: α -D-ribosa-1-metilfosfonato- 5-trifosfato difosfatasa, organismo *Rhizobium meliloti*, código uniprot Q92V74 · Q92V74_RHIME.
- Enzima: α -D- ribosa-1-metilfosfonato 5-fosfato CP -liasa, organismo *Rhizobium meliloti*, código Q52987 · PHNJ_RHIME.
- Enzima: 5-fosfo- α -D-ribosil fosfato 1,2-cíclico, organismo *E. coli* y *R. meliloti*, códigos P16692 · PHNP_ECOLI y Q92UG1 · Q92UG1_RHIME.
- Enzima Ribosa 1,5 bifosfoquinasa, organismo *E. coli* y *R. meliloti*, P75250 · IPYR_MYCPN y Q92LH1 · IPYR_RHIME

Del análisis anterior se obtienen 17 secuencias (incluyendo isoformas) como base de información. La búsqueda de secuencias relacionadas en la base de datos de Swiss-Prot se llevó a cabo porque su información es curada por equipos de expertos, la información de secuencias de aminoácidos obtenidas se constituyó en el cimiento para identificación de sus contrapartes en el genoma de *P. extremaustralis* cepa 2E-UNGS aislada de Rio Reconquista en Argentina (tax id: 359110), bajo los parámetros de valor E (más cercano a 0.0), porcentaje de identidad (superior al 40%), y cobertura (superior al 70%) en relación a los resultados de la base de datos Swiss-Prot (Tabla 3).

Tabla 3. Enzimas relacionadas con degradación de glifosato desde las bases de datos Metacyc, Swiss- Prot y el genoma de *P. extremaustralis* cepa 2E-UNGS.

METACYC					SWISS-PROT				<i>Pseudomonas extremaustralis</i> (taxid:359110)			
RUTA	ENZIMA	FAMILIA DE ENZIMAS	ORGANISMO	CODIGO UNIPROT	CODIGO	VALOR E	IDENTIDAD	COBERTURA	CODIGO	VALOR E	IDENTIDAD	COBERTURA
Glyphosate degradation I	Glyphosate oxidoreductase (Os): Os-gox	Glyphosate oxidoreductase	Ochrobactrum sp. G-1	D2KI28 · D2KI28_9HYPH	Q6FFR5.1	1E-50	29.12%	95%	WP_078834081.1	0.0	59.90%	99%
Glyphosate degradation II	Glycine Oxidase (ThiO)4	Glycine oxidase	Bacillus subtilis (strain 168)	O31616 · GLYOX_BACSU	O31616.1	0.0	100.00%	100%	WP_042946998.1	5E-39	28.82%	90%
Glyphosate degradation III	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnI	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnI	Rhizobium meliloti (strain 1021) (Ensifer meliloti) (Sinorhizobium meliloti)	Q52986 · PHNI_RHIME	Q52986.1	0.0	100.00%	100%	KAA8561474.1	0.003	33.33%	16%
	α -D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate diphosphatase phnM	NO REGISTRA	Rhizobium meliloti (strain 1021) (Ensifer meliloti) (Sinorhizobium meliloti)	Q92V74 · Q92V74_RHIME	P16689.2	2E-118	46.28%	98%	WP_150295455.1	7e-08	24.63%	94%
	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-phosphate C-P-lyase	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-phosphate C-P-lyase	Rhizobium meliloti (strain 1021) (Ensifer meliloti) (Sinorhizobium meliloti)	Q52987 · PHNJ_RHIME	Q52987.1	0.0	100.00%	100%	WP_010567168.1	0.0	62.26%	99%
	5-phospho- α -D-ribosyl 1,2-cyclic phosphate phosphodiesterase [PhnP]2 phosphoribosyl 1,2-cyclic phosphate phosphodiesterase duf1045	Phosphoribosyl 1,2-cyclic phosphate phosphodiesterase	Escherichia coli (strain K12)	P16692 · PHNP_ECOLI	P16692.1	0.0	100.00%	100%	WP_142579792.1	0.28	31.82%	17%
		DUF1045 domain-containing protein	Rhizobium meliloti (strain 1021) (Ensifer meliloti) (Sinorhizobium meliloti)	Q92UG1 · Q92UG1_RHIME	A6SU94.1	2E-31	34.39%	81%	WP_275969407.1	1E-26	39.01%	39%
	ribose 1,5-bisphosphate phosphokinase phnN ribose 1,5-bisphosphate phosphokinase phnN	Ribose 1,5-bisphosphate phosphokinase PhnN	Escherichia coli (strain K12)	P16690 · PHNN_ECOLI	P16690.1	6E-142	100.00%	100%	WP_010565018.1	5e-41	48.91%	94%
		Ribose 1,5-bisphosphate phosphokinase PhnN	Rhizobium meliloti (strain 1021) (Ensifer meliloti) (Sinorhizobium meliloti)	Q92V75 · Q92V75_RHIME	A9CKM5.1	4,00E-64	51.14%	90%	WP_262051164.1	6E-32	40.98%	97%
adenine phosphoribosyltransferase [Apt]2	Adenine phosphoribosyltransferase	Escherichia coli (strain K12)	P69503 · APT_ECOLI	A1A8D5.2	2e-133	99.45%	100%	WP_010563856.1	3E-48	46.47%	92%	

	adenine phosphoribosyltransferase apt	Adenine phosphoribosyltransferase 1	Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) (Baker's yeast)	P49435 · APT1_YEAST	P49435.3	7E-139	100.00%	100%	WP_078834337.1	9E-28	33.14%	90%
	adenine phosphoribosyltransferase [APT1]2	Adenine phosphoribosyltransferase 1, chloroplastic	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)	P31166 · APT1_ARATH	P31166.2	0.0	99.59%	100%	WP_010563856.1	4E-38	40.83%	69%
	adenine phosphoribosyltransferase APT1	Adenine phosphoribosyltransferase	Rhizobium meliloti (strain 1021) (Ensifer meliloti) (Sinorhizobium meliloti)	Q92N62 · APT_RHIME	Q92N62.1	2E-134	100.00%	100%	WP_078834337.1	8E-52	45.76%	98%
	adenine-guanine phosphoribosyltransferase	Alkaline phosphatase	Escherichia coli (strain K12)	P00634 · PPB_ECOLI	P00634.1	0.0	100.00%	100%	WP_150095468.1	0.086	32.56%	9,00%
	inorganic pyrophosphatase [Ppa]6	Inorganic pyrophosphatase	Escherichia coli (strain K12)	P0A7A9 · IPYR_ECOLI	P0A7A9.2	5E-135	100.00%	100%	SDG24679.1	5E-84	67.43%	99%
	alkaline phosphatase [PhoA]2	Inorganic pyrophosphatase	Mycoplasma pneumoniae (strain ATCC 29342 / M129 / Subtype 1) (Mycoplasmoides pneumoniae)	P75250 · IPYR_MYCPN	P75250.1	1E-140	100.00%	100%	KAA8558167.1	2e-22	37.74%	84%
	inorganic diphosphatase ppa inorganic pyrophosphatase ppa	Inorganic pyrophosphatase	Rhizobium meliloti (strain 1021) (Ensifer meliloti) (Sinorhizobium meliloti)	Q92LH1 · IPYR_RHIME	Q92LH1.1	1e-136	100.00%	100%	SDG24679.1	1E-63	52.30%	98%

Sobre los resultados obtenidos, el valor E estuvo siempre para todos los casos en 0.0 o muy cercano. Las medias de los datos de porcentaje de identidad cuando se compararon las secuencias de la base de datos de Swiss-Prot con sus contrapartes de Metacyc (84.9%), estuvo por encima de la media cuando se determinan las secuencias relacionadas en el genoma de *P. extremaustralis* 2E-UNGS (42.7%), y la prueba t de student indica que hay diferencias significativas ($p < 0.05$), caso similar se presentó para el caso del porcentaje de cobertura (97.8 y 79.7% respectivamente) (Figura 9). Cuando se observa la distribución de los datos para identidad y cobertura (Figuras 10 y 11) para las secuencias relacionadas con degradación de glifosato de la base de datos de Swiss-Prot contra sus contrapartes de Metacyc, y las secuencias relacionadas en el genoma de *P. extremaustralis* 2E-UNGS, se encuentra que los datos se agrupan diferencialmente causado por las amplias discrepancias en identidad y cobertura de las secuencias para las rutas de degradación de glifosato II y III (Tabla 3). El mejor resultado se encuentra para la enzima glifosato-oxidoreductasa (valor E: 0.0, identidad: 59.90, cobertura: 99%).

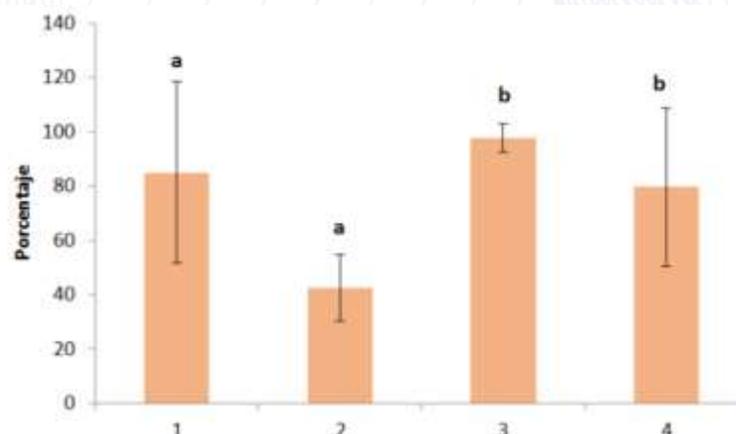


Figura 9. Análisis de las secuencias relacionadas con degradación de glifosato para identidad en Swiss-Prot (1) y el genoma de *P. extremaustralis* 2E-UNGS (2), y cobertura para los mismos casos (3 y 4 respectivamente). Letras del mismo tipo indican diferencias significativas.

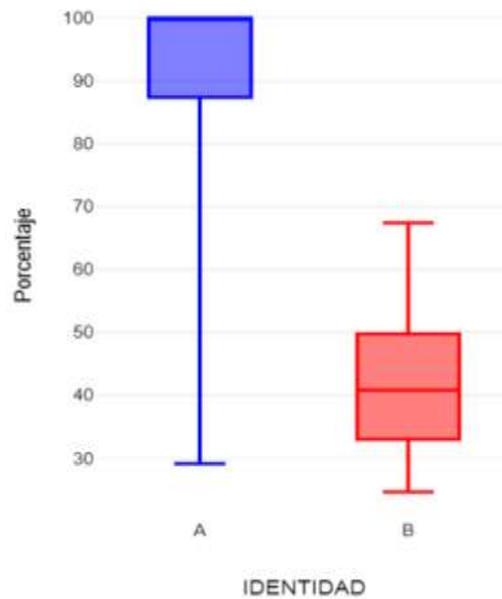


Figura 10. Box plot de las secuencias relacionadas con degradación de glifosato para identidad en Swiss-Prot (A) y el genoma de *P. extremaustralis* 2E-UNGS (B).

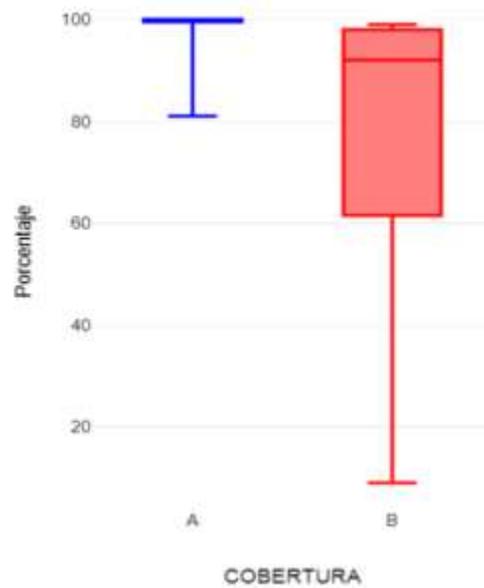


Figura 11. Box plot de las secuencias relacionadas con degradación de glifosato para cobertura en Swiss-Prot (A) y el genoma de *P. extremaustralis* 2E-UNGS (B).



CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A DEGRADACIÓN DE GLIFOSATO EN *Pseudomonas extremaustralis* 2E-UNGS

Se realiza el análisis de las secuencias relacionadas con degradación de glifosato con la herramienta ProtParam, que calcula parámetros físico-químicos para una secuencia de una proteína [101]. El peso molecular se mide en Daltons (Da), y se precisa como el peso de un mol de moléculas (aludiendo a una sola molécula) [102], estando como razonamiento para establecer la dimensión de la cadena polimérica ya que es directamente proporcional con el peso molecular. Este dato es significativo porque las cadenas de aminoácidos se logran distinguir según su peso molecular; las moléculas con pesos moleculares que constan de varios cientos o miles de Da se citan como polipéptidos, y aquellas con pesos moleculares bajos, generalmente de menos de 50 aminoácidos se llaman péptidos [103]. El punto isoeléctrico (pI) determina la capacidad de una proteína para moverse a través de diferentes compartimentos celulares y su potencial función, indica ese pH donde la carga neta de una proteína es cero [104]. El peso molecular y el pI de las proteínas son parámetros importantes que controlan su localización subcelular y posteriormente su función. De igual manera estos valores permiten realizar estudios de proteínas que impliquen análisis instrumentales electroforesis en gel 2D, cromatografía líquida, espectroscopia de masas y cromatografía de proteínas de rayos X. Además, el peso molecular y el pI de proteínas individuales pueden permitirnos comprender su importancia funcional en diferentes especies [105].

El índice de inestabilidad provee valoración de la estabilidad de una proteína, asumiendo tanto factores termodinámicos cinéticos, es una noción que está amarrada al tiempo medio en que una estructura proteica conserva su distribución y función en determinadas situaciones, si se



encuentra que la proteína persiste en fase natural nativa y funcional durante largos periodos con su funcionalidad intacta entonces se considera cinéticamente estable, pero desde la termodinámica se reseña cuando la cadena polipeptídica logra la estructura nativa o plegamiento, que soporta la formación de interacciones no covalentes (débiles) definidas por un cambio en la energía libre de Gibbs al saltar del estado inicial al final [106].

La constitución de residuos positivos y negativos puede llevar a cambios entre proteínas con ubicaciones intracelulares distintas, en pH de neutralidad las proteínas dentro de la célula desarrollan especies que son cargadas negativamente, se ha observado que las proteínas del núcleo se especifican por tener un proporción congruentemente alta de residuos positivos, asumiendo que las cargas positivas sirven para reconocer la doble hebra de ADN cargada de forma negativa (aniónica) [103].

El índice alifático corresponde al volumen relativo que tienen las cadenas radicales de aminoácidos alifáticos en un polipéptido, estos aminoácidos que corresponden a este conjunto son alanina (Ala), valina (Val), isoleucina (Ile) y leucina (Leu), esta medida es mucho mayor en proteínas de organismos de ambientes extremos (alta temperatura), por lo tanto, puede suponerse que esto tiene relación positiva con la termoestabilidad [107].

El índice GRAVY establece la hidrofobicidad de una proteína, esta hidropatía va en una escala de -2 a +2 para la mayor parte de las proteínas, los valores positivos indican que las proteínas son hidrofóbicas [108]. El valor medio de hidropaticidad aporta un parámetro acerca del carácter



hidrofóbico o no (hidrófilico) de una proteína con relación al tipo y número de aminoácidos que esta posea [108].

La Tabla 4 presenta los resultados de la caracterización bioquímica *in silico* de las proteínas asociadas con degradación de glifosato en las bases de datos de Metacyc y Swiss-Prot, y el genoma de *P. extremaustralis* 2E-UNGS. Se aplicó la prueba t de student a los datos para determinar los casos en que había diferencias significativas, aquellas secuencias del genoma de la bacteria de este trabajo que no difieran estadísticamente en relación a las depositadas en las bases de datos serían candidatos más probables de ser responsables de degradación de glifosato.

Tabla 4. Resultados de Protparam para caracterización bioquímica en las enzimas asociadas a degradación de glifosato en *P. extremaustralis* 2E-UNGS (indicado como Pe) contra las secuencias modelo de las bases de datos Metacyc y Swiss-Prot. La prueba de t de student compara cada secuencia de aminoácidos para degradación de glifosato en *P. extremaustralis* 2E-UNGS para cada parámetro (asterisco indica diferencias significativas al 95%).

Código proteínas degradadoras de glifosato			Peso molecular (Da)			Punto Isoeléctrico (pI)			Residuos cargados negativamente Asp+Glu			Residuos cargados positivamente Arg+Lys			Índice de Inestabilidad			Índice Alifático			Promedio de hidropaticidad GRAVY		
Metacyc	Swiss-Prot	Pe	Metacyc	Swiss-Prot	Pe	Metacyc	Swiss-Prot	Pe.	Metacyc	Swiss-Prot	Pe	Metacyc	Swiss-Prot	Pe.	Metacyc	Swiss-Prot	Pe.	Metacyc	Swiss-Prot	Pe	Metacyc	Swiss-Prot	Pe
D2KI28 · D2KI28_9HYPH	Q6FFR5.1	WP_078834081.1	46140,16	46298,78	47239,24*	9,59	6,03	7,64	37	43	44	47	39	45	31,51	26,83	30,84	89,26	86,13	90,88	-0,042	-0,205	-0,109
O31616 · GLYOX_BACSU	O31616.1	WP_042946998.1	40936,83	40936,83	38709,49*	5,92	5,92	5,5	48	48	32*	40	40	24*	35,71	35,71	32,44	83,82	83,82	104,2*	-0,174	-0,174	0,264*
Q52986 · PHNI_RHIME	Q52986.1	KAA8561474.1	40775,38	40775,38	45341,42*	5,11	5,11	8,56*	60	60	43*	44	44	46	40,33	40,33	36,14	88,02	88,02	95,64*	-0,279	-0,279	0,043*
Q92V74 · Q92V74_RHIME	P16689.2	WP_150295455.1	41587,04	42010,44	48960,06	5,72	6,06	6,76	55	50	51	44	41	48	39,85	39,68	32,41*	92,74	89,6	98,49	-0,217	-0,393	-0,123
Q52987 · PHNJ_RHIME	Q52987.1	WP_010567168.1	33382,92	33382,92	47209,22*	52,7	5,27	7,64	45	45	44	33	33	45*	45,5	45,5	30,84*	75,89	75,89	91,11*	-0,402	-0,402	0,104*
P16692 · PHNP_ECOLI	P16692.1	WP_142579792.1	27847,78	27847,78	22435,4	5,9	5,9	5,24*	25	25	26	18	18	21	52,01	52,01	25,72*	85,12	85,12	90,65	-0,115	-0,115	-0,140
Q92UG1 · Q92UG1_RHIME	A6SU94.1	WP_275969407.1	29165,8	50253,39	19956,8	6,45	7,75	6,9	28	51	20	26	52	20	48,48	44,22	26,96*	86,6	88,65	109,2*	-0,065	-0,184	0,13
P16690 · PHNN_ECOLI	P16690.1	WP_010565018.1	20729,59	20729,59	19928,74*	8,53	8,53	6,9	18	18	20	20	20	20	50,31	50,31	26,96*	98,7	98,7	108,18*	-0,303	-0,303	0,117*
Q92V75 · Q92V75_RHIME	A9CKM5.1	WP_262051164.1	20804,64	19645,07	19875,69	7,04	6,59	6,42	24	21	20	24	20	19	45,83	48,7	26,96	88,67	84,81	108,18*	-0,073	-0,197	0,155*
P69503 · APT_ECOLI	A1A8D5.2	WP_010563856.1	19858,88	19759,75	20026,19*	5,26	5,26	4,9	24	24	24	20	20	17	24,73	24,81	33*	108,14	107,14	105,66*	0,023	0	0,264*
P49435 · APT1_YEAST	P49435.3	WP_078834337.1	20586,86	20586,86	20012,12*	5,03	5,03	4,79*	24	24	24	18	18	16	25,93	25,93	33,47	105,45	105,45	105,66	0,15	0,15	0,266
P31166 · APT1_ARATH	P31166.2	WP_010563856.1	26395,92	26282,76	20026,19	8,66	8,66	4,9	28	28	24*	31	31	17	28,64	29,07	33*	108,81	107,64	105,66*	0,16	0,142	0,264*
Q92N62 · APT_RHIME	Q92N62.1	WP_078834337.1	19371,56	19371,56	20012,12*	6,52	6,52	4,79*	23	23	24	22	22	16*	24,56	24,56	33,47	106,28	106,28	105,66	0,106	0,106	0,266*
P00634 · PPB_ECOLI	P00634.1	WP_150095468.1	49438,59	49438,59	34787,76*	5,74	5,74	8,79*	52	52	36*	44	44	38	31,78	31,78	39,51*	79,51	79,51	99,87*	-0,313	-0,313	-0,308
P0A7A9 · IPYR_ECOLI	P0A7A9.2	SDG24679.1	19703,56	19703,56	20634,62*	5,03	5,03	5,03	29	29	26	20	20	20	38,83	38,83	28,4*	90,85	90,85	89,14*	-0,272	-0,272	0,247*
P75250 · IPYR_MYCPN	P75250.1	KAA8558167.1	21368,71	21368,71	20686,71*	5,48	5,48	5,16*	31	31	26*	27	27	20*	17,8	17,8	25,36	94,73	94,73	87,04*	-0,376	-0,376	0,248*
Q92LH1 · IPYR_RHIME	Q92LH1.1	SDG24679.1	20049,15	20049,15	20634,62*	5,67	5,67	5,03	27	27	26	22	22	20	26,48	26,48	28,4*	87,46	87,46	89,14	-0,339	-0,339	-0,247
MEDIA (M)			29302,55	30496,54	28616,26	9,08	6,15	6,174	34	35,24	30	29,412	30,06	26,59	35,79	35,455	30,82	92,36	91,75	99,08	-0,156	-0,185	0,014
DESVIACIÓN ESTANDAR (σ)			10560,19	11828,23	11929,66	11,322,30	1,146	1,38	12,94	13,38	9,84	10,48	11,22	12,16	10,36	10,44	3,91	9,98	9,93	8,01	0,188	0,183	0,215

En el desarrollo de los resultados obtenidos se logra adquirir las siguientes consideraciones:

1. La verificación de las secuencias tomadas de la base de datos de MetaCyc contra sus contrapartes de la base de datos de Swiss-Prot (curadas), bajo los parámetros de valor E, identidad y cobertura, que indican las probabilidades de la ruta metabólica que toma el organismo para realizar la degradación de glifosato, ya que estos parámetros son un indicador de relación estructural [109]. En la degradación de glifosato se evidencian tres rutas, la primera ruta depende de la glifosato-oxidoreductasa, y la segunda estriba en la glicina oxidasa, pero la tercera ruta necesita siete enzimas para que la ruta metabólica suceda. Cuando se revisa la identidad de las enzimas relacionadas en *P. extremaustralis* 2E-UNGS, se puede encontrar que los mejores datos se dan para la enzima glifosato-oxidoreductasa (valor E: 0.0, identidad: 59.90, cobertura: 99%), mientras que para la glicina-oxidasa la identidad es muy baja (28.82%), y para la tercera ruta la identidad y cobertura de las enzimas implicadas es muy variable en identidad (24.63% hasta 67.43%) y cobertura (9% hasta 99%) (Tabla 3), y como esta ruta implica varias enzimas, se descarta una afinidad funcional de forma teórica. La medición de la similitud de secuencias con el valor E (a un valor bajo corresponde a mayor cercanía en la similitud de las secuencias de aminoácidos comparadas) que el resultado sea 0.0 para glifosato-oxidoreductasa (Tabla 3) indica que su alineamiento es ideal y por ende la secuencia tiene alta congruencia fiable y no se debe al azar [110]. Por esta razón se considera que *P. extremaustralis* 2E-UNG usaría primordialmente la ruta dependiente de glifosato-oxidoreductasa para degradación de glifosato.

2. En el caso del análisis bioquímico *in silico* para las diferentes secuencias relacionadas a degradación de glifosato de *P. extremaustralis* 2E-UNG, al compararse estadísticamente con sus contrapartes de obtenidas de Metacyc y Swiss-Prot, se puede observar que la enzima glifosato-oxidoreductasa solo tiene diferencias significativas para el parámetro de peso molecular, a diferencia de las demás enzimas (Tabla 4), lo cual apoya la idea de esta enzima sería la primera opción si se coloca a *P. extremaustralis* 2E-UNG en frente del glifosato.

Valorando la enzima glifosato-oxidoreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG se encontró que el aminoácido más abundante de la proteína es Ala con un total de 49 residuos, es decir 11,3%, Ala se cataloga como hidrofóbica y alifática. El segundo aminoácido más cuantioso es Leu, es hidrófobo debido a su cadena lateral isobutilo alifática [111], tiene 45 residuos cargados positivamente (Arg+Lys) y 44 residuos cargados negativamente (Asp + Glu).

Para el desarrollo del análisis *in silico* de las enzimas, se realizó la comparación de secuencias de la enzima glifosato-oxidoreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG con su contraparte de Swiss-Prot, mediante el programa Clustal Omega (Figura 18), donde se observa alta correspondencia, incluso cuando hay sustituciones tienden a ser conservativas (aminoácido con las mismas propiedades).

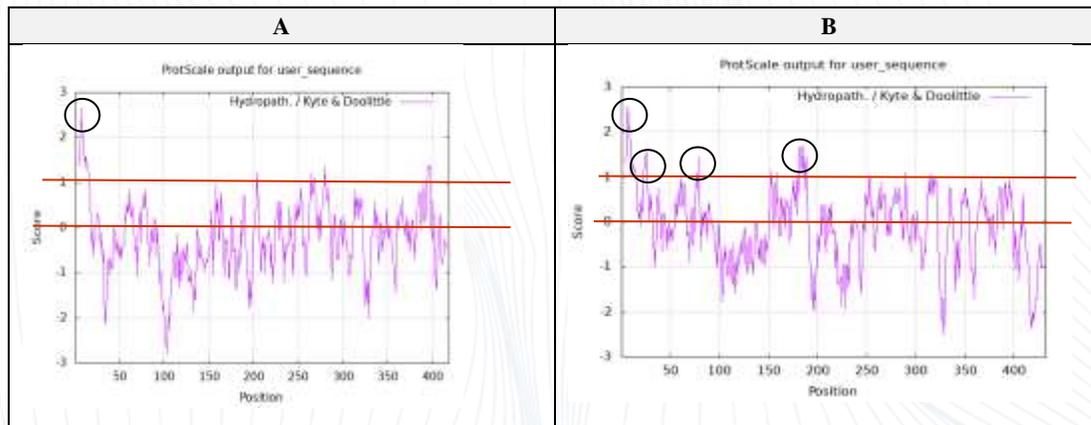


Figura 13. Resultado del análisis de hidropaticidad de Kyle y Doolittle para la enzima glifosato-oxidorreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG. (A). Secuencia de la enzima glifosato-oxidorreductasa de Swiss-Prot Q6FFR5.1. (B). Secuencia de la enzima glifosato-oxidorreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG. Los círculos indican aminoácidos altamente hidrofóbicos.

Un conocimiento preciso de la accesibilidad de los residuos y a los sitios activos de las proteínas que se encuentran en la superficie celular ayudaría a predecir la estructuras secundarias relación y función. Para el análisis de la enzima glifosato-oxidorreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG en residuos accesibles (Figura 14), se logra observar dos aminoácidos bien definidos en la posición 100 y 150, los cuales corresponden a Arg y Ala. La Arg es un aminoácido versátil desde las vías metabólicas y procesos asociados, entre sus funciones están el de ser sustrato de la síntesis de proteínas, péptidos activos, cooperación en la eliminación celular de amonio, excreción de hormonas y síntesis de poliaminas o creatina (precursor del óxido nítrico), un efecto en diferentes escalas participante en la vasodilatación, neurotransmisión y con actividad hacia patógenos e incluso cáncer [113]. La Ala es el aminoácido que sigue a la glicina, siendo el más abundante representado en un promedio del 9% del total. En su forma libre se puede transformar

en piruvato mediante una desaminación, conectando rutas metabólicas como la glucólisis, la gluconeogénesis y ciclo de Krebs [114].

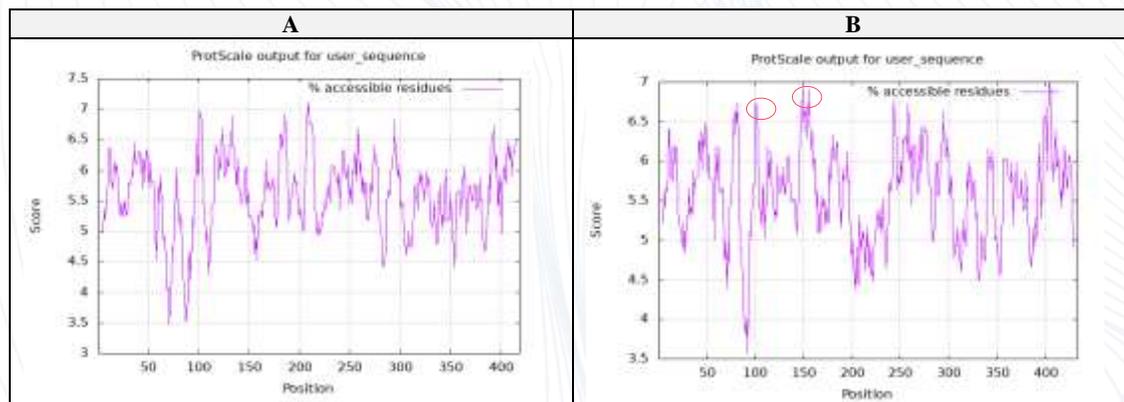


Figura 14. Análisis de aminoácidos accesibles para la enzima glifosato-oxidorreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG. (A). Secuencia de la enzima glifosato-oxidorreductasa de Swiss-Prot Q6FFR5.1. (B). Secuencia de la enzima glifosato-oxidorreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG. Los círculos indican aminoácidos altamente accesibles.

Otro aspecto a tener en cuenta es la flexibilidad, la cual es una característica intrínseca de las estructuras proteicas, directamente relacionada con sus funciones [115]. Analizando los resultados para la secuencia de la enzima glifosato-oxidorreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG en cuanto a aminoácidos flexibles (Figura 15), la proteína cuenta con regiones con picos superiores de flexibilidad cercanas a 0.5 en las áreas de aminoácidos del 1-50, 200-250, y 350-400, en la posición 50 se observa el aminoácido Gly, aunque la zona de mayor flexibilidad esta entre los aminoácidos 350-400. La Gly es el más pequeños de los aminoácidos y uno de los denominados “no esenciales”, consta de una sola molécula de carbono unida a un grupo amino y un grupo carboxilo, su dimensión pequeña ayuda a su desempeño como enlace flexible en proteínas, por ejemplo para generación de alfa-hélices, se intercambia con Serina (Ser) para suministrar vías de intercambio de grupos de un carbono activado [116].

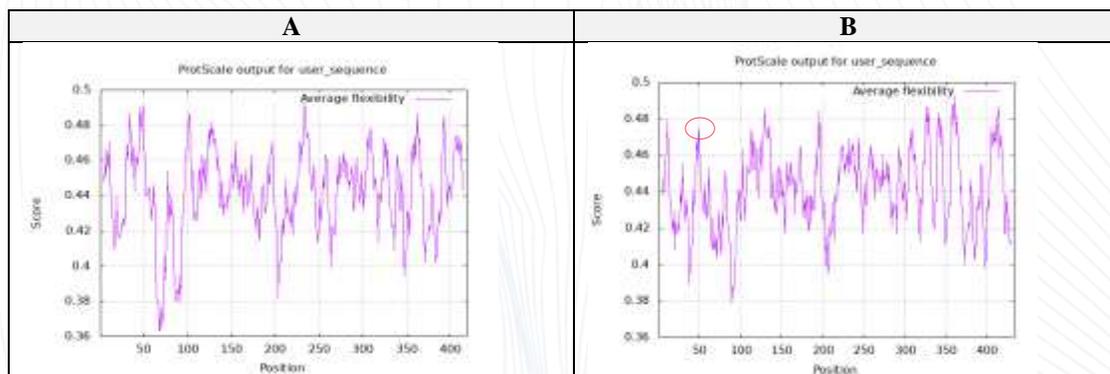


Figura 15. Análisis de flexibilidad para la enzima glifosato-oxidoreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG. (A). Secuencia de la enzima glifosato-oxidoreductasa de Swiss-Prot Q6FFR5.1. (B). Secuencia de la enzima glifosato-oxidoreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG. El círculo indica el aminoácido Gly.

Con el fin de hacer un estudio estructural de la enzima glifosato-oxidoreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG, se realizó un análisis con el programa Blastp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) contra la base de datos Protein Data Bank - PDB (<https://www.rcsb.org/>) encontrándose como el mejor resultado la estructura cristalizada de Iminodiacetato oxidasa (IdaA) de *Chelativorans sp.* BNC1, (6PXS) (Valor E: $7e-16$, identidad: 24.52%, cobertura: 94%), la cual es una oxidoreductase dependiente de FAD [*Chelativorans sp.* BNC1] [117], con la finalidad de identificar la probable disposición de alfa-hélices y beta-láminas (Figura 16), observándose mejor correspondencia estructural en la alfa-hélice 1 (GVIGVTSAYYLAR), alfa-hélice 4 (PWAA), alfa-hélice 12 (LGSYSPQLLKPLG) y alfa-hélice 15 (HGTLGWTMACGSGRLLADLMAK), y para las beta láminas 1 (VLVLGS), 6 (ALRL), 16 (RIRV) y 18 (IVGA), lo cual puede apoyar la noción de que esta oxidoreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG puede cumplir una funcionalidad típica de este tipo de enzimas. Se ha

hexapéptidos que son luego promediados a lo largo de toda a secuencia y considera que los picos están asociados a determinantes antígenos [119], para verificar la similitud de las secuencias de la enzima glifosato-oxidoreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG con la asociada proveniente de Swiss-Prot (Q6FFR5.1) (Tabla 3), con este parámetro se identificó una similitud del 96% para el segmento antigénico para estas secuencias (Figura 17).

SWISS	RDFLKPLALNLPVYPVKGYSLTIPIVQPEFAPQSTVLDET	40
PSEUDOMONAS	RDFLKPLDLQLPVYPVKGYSLTIPIVDPAFAPQSTVLDET	40
	***** * :***** : * *****	

Figura 17. Perfil de antigenicidad para la enzima glifosato-oxidoreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG. Se compara la enzima glifosato-oxidoreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG con su contraparte de Swiss-Prot (Q6FFR5.1).

CONCLUSIONES

1. El estudio de patentes permitió evidenciar protección hacia varias tecnologías basadas en bacterias para degradación de glifosato, incluyendo una patente dirigida específicamente a la protección de una cepa de *P. extremaustralis* para degradación de glifosato. Este estudio permite entrever que el país que más llevan avances en esta área es China, y que en este lado del planeta los métodos basados en biorremediación por bacterias del glifosato estarían libres de DPI y se podrían desarrollar y aplicar libremente, sin infringir derechos de terceros.
2. Se identificaron las enzimas asociadas a tres rutas para la degradación de glifosato, y se pudo evidenciar que hay secuencias genómicas de *P. extremaustralis* 2E-UNG relacionadas con estas rutas en diversos grados de identidad y cobertura según análisis con el programa Blast.
3. Se encontró que la ruta dependiente de la enzima glifosato-oxidoreductasa presenta mayor similitud cuando se analizó la secuencia relacionada en el genoma de *P. extremaustralis* 2E-UNG, por lo cual habría una mayor probabilidad de que esta sea la vía metabólica usada por este microorganismo para la degradación de glifosato.
4. El análisis bioquímico *in silico* de la enzima glifosato-oxidoreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG indica correspondencia estructural para los diferentes aspectos estudiados, incluyendo punto isoeléctrico, residuos positivos y negativos, índice alifático, índice GRAVY, índice de hidropaticidad, flexibilidad, residuos accesibles, o regiones antigénicas, entre otros. Esto apoya la noción de una relación funcional para degradación de glifosato.



5. Cuando se observa la estructura secundaria de la enzima glifosato-oxidoreductasa de *P. extremaustralis* 2E-UNG se encuentra que su disposición de alfa-helices y beta-láminas tiene una correspondencia variable con una oxidoreductasa típica determinada experimentalmente, es posible que el plegamiento 3D sea similar y con ello la función básica de este tipo de enzimas sea conservado.
6. Este trabajo aporta evidencia para el uso de la cepa de *P. extremaustralis* 2E-UNG, o de otras cepas de *P. extremaustralis*, para degradación de glifosato en cultivos agrícolas, lo cual debe ser validado experimentalmente.

GLOSARIO

A

ADN: ácido desoxirribonucleico, es la molécula que contiene la información hereditaria de los seres vivos, el ADN está ubicado en el núcleo de la célula. Su estructura es en forma de doble hélice entrecruzada y complementaria, está compuesta por un azúcar (desoxirribosa) y un grupo fosfato unidos a cuatro bases nitrogenadas, Adenina (A), Guanina (G), citosina (C) y Timina (T).

Aminoácidos: moléculas en base de carbono que se unen para formar proteínas. Cada aminoácido se compone de Carbono (C), Hidrogeno (H), Oxígeno (O) y Nitrógeno (N), con cadenas laterales particulares para cada tipo de aminoácido. Los seres vivos usan 20 tipos de aminoácidos.

B

Blast: Software en línea capaz de identificar patrones de similitud en secuencias de ADN y aminoácidos, calculando su significancia estadística.

Expasy: Es el Sistema Experto de Análisis de Proteínas del Instituto suizo de bioinformática, tiene la capacidad de analizar secuencias y estructuras de proteínas.

Base de datos Swiss Prot: es una base de datos que proporciona un recurso completo y libre sobre secuencias de proteínas e información funcional.

Base de datos Metacyc: es una base de datos de vías metabólicas dilucidadas experimentalmente, en ella encontramos el metabolismo primario y secundario, así como las reacciones, enzimas y genes asociados. Esta base de datos contiene una enciclopedia para predecir rutas metabólicas en genomas asociados, asimismo apoya la ingeniería metabólica a través de base de datos de enzimas y ayuda a la investigación metabólica.

C

Cobertura: número de veces que una porción del genoma es secuenciada. Indicando si el parecido con la secuencia de análisis es a lo largo de la secuencia (100%) o solamente en una parte de la secuencia (<100%)

Enzima: es un catalizador biológico, gracias a su presencia la célula es capaz de desarrollar reacciones químicas a gran velocidad hasta alcanzar un equilibrio.

E-value: es una estimación del número esperado de alineamientos con una puntuación particular. Cuanto menor sea el valor E, mejor será el acierto. El valor E depende de la



longitud de la secuencia de consulta y del tamaño de la base de datos. El valor E depende de la longitud de la secuencia de consulta y del tamaño de la base de datos. algunas reglas generales que pueden usarse como guía.

- Valor $E < 10e-100$ Secuencias idénticas. Obtendrá alineaciones largas en toda la consulta y secuencia de aciertos.
- $10e-100 < \text{Valor } E < 10e-50$ Secuencias casi idénticas. Una gran parte de la proteína de consulta coincide con la base de datos.
- $10e-50 < \text{Valor } E < 10e-10$ Secuencias estrechamente relacionadas, podrían ser una coincidencia de dominio o similar.
- $10e-10 < \text{Valor } E < 1$ Podría ser un verdadero homólogo, pero es un área gris.
- $\text{Valor } E > 1$ Lo más probable es que las proteínas no estén relacionadas
- $\text{Valor } E > 10$ Lo más probable es que las visitas sean basura, a menos que la secuencia de consulta sea muy corta.

G

Genómica: es un campo de la biología que se centra en el estudio del genoma de un organismo, mediante la identificación y caracterización de los genes y elementos funcionales, así como su interacción. Esta a su vez se subdivide en tres áreas la genómica funcional, genómica estructural y genómica comparativa.

I

In silico: es la expresión que significa que este hecho por vía, simulación computacional. En este se utiliza modelos informáticos para predecir a las incidencias probables, simulaciones de situaciones reales.

Identidad: es la coincidencia total entre los pares de una secuencia. Es decir, cuantos de los nucleótidos de la secuencia están presentes en la misma posición en cada una de las secuencias a analizar

S

Secuencia de ADN: el orden de las cuatro bases nitrógenadas determina el patrón de aminoácidos en las proteínas resultantes, mediante el proceso de secuenciación de Sanger y técnicas de avanzada derivadas se puede determinar la estructura de la molécula de ADN particular de cada ser vivo (Genoma), y así entender la función de los genes y otros tipos de secuencias.



Similitud: se considera el grado de coincidencia entre dos pares de secuencias, este valor se mide en porcentaje.

REFERENCIAS

- [1] N. Peladarinos, D. Piromalis, V. Cheimaras, E. Tserepas, R. A. Munteanu, and P. Papageorgas, “Enhancing Smart Agriculture by Implementing Digital Twins: A Comprehensive Review,” *Sensors*, vol. 23, no. 16. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Aug. 01, 2023. doi: 10.3390/s23167128.
- [2] Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y agricultura sostenible, “Uso de la tierra en la agricultura según las cifras,” <https://www.fao.org/sustainability/news/detail/es/c/1279267/#:~:text=La%20superficie%20de%20tierra%20destinada,y%20pastizales%20para%20el%20pastoreo.>
- [3] T. Kocsis, B. Biró, Á. Ulmer, M. Szántó, and Z. Kotroczó, “Time-lapse effect of ancient plant coal biochar on some soil agrochemical parameters and soil characteristics,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, no. 2, pp. 990–999, Jan. 2018, doi: 10.1007/s11356-017-8707-0.
- [4] G. M. Dill, “Glyphosate-resistant crops: History, status and future,” in *Pest Management Science*, Mar. 2005, pp. 219–224. doi: 10.1002/ps.1008.
- [5] S. O. Duke and S. B. Powles, “Glyphosate: A once-in-a-century herbicide,” in *Pest Management Science*, Apr. 2008, pp. 319–325. doi: 10.1002/ps.1518.
- [6] J. Clapp, “Explaining Growing Glyphosate Use: The Political Economy of Herbicide-Dependent Agriculture,” *Global Environmental Change*, vol. 67, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.gloenvcha.2021.102239.
- [7] G. M. Williams, R. Kroes, and I. C. Munro, “Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans,” *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 31, no. 2 I, pp. 117–165, 2000, doi: 10.1006/rtph.1999.1371.
- [8] W. Zhang *et al.*, “Characterization of a novel glyphosate-degrading bacterial species, *Chryseobacterium* sp. Y16C, and evaluation of its effects on microbial communities in glyphosate-contaminated soil,” *J Hazard Mater*, vol. 432, p. 128689, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.128689.
- [9] A. Lopes *et al.*, “Evaluation of the genotoxic, mutagenic, and histopathological hepatic effects of polyoxyethylene amine (POEA) and glyphosate on *Dendropsophus minutus* tadpoles,” *Environmental Pollution*, vol. 289, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.envpol.2021.117911.
- [10] M. J. Davoren and R. H. Schiestl, “Glyphosate Based Herbicides and Cancer Risk: A Post IARC Decision Review of Potential Mechanisms, Policy, and Avenues of Research”, doi: 10.1093/carcin/bgy105/5061168.
- [11] N. de Castilhos Ghisi, N. R. Zuanazzi, T. M. C. Fabrin, and E. C. Oliveira, “Glyphosate and its toxicology: A scientometric review,” *Science of the Total Environment*, vol. 733. Elsevier B.V., Sep. 01, 2020. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139359.
- [12] F. Álvarez *et al.*, “Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate,” *EFSA Journal*, vol. 21, no. 7, Jul. 2023, doi: 10.2903/j.efsa.2023.8164.
- [13] I. T. Ermakova, N. I. Kiseleva, T. Shushkova, M. Zharikov, G. A. Zharikov, and A. A. Leontievsky, “Bioremediation of glyphosate-contaminated soils,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 88, no. 2, pp. 585–594, Sep. 2010, doi: 10.1007/s00253-010-2775-0.

- [14] A. H. C. Van Bruggen *et al.*, “Environmental and health effects of the herbicide glyphosate,” *Science of the Total Environment*, vol. 616–617. Elsevier B.V., pp. 255–268, Mar. 01, 2018. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.309.
- [15] W. A. Battaglin, M. T. Meyer, K. M. Kuivila, and J. E. Dietze, “Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation,” *J Am Water Resour Assoc*, vol. 50, no. 2, pp. 275–290, 2014, doi: 10.1111/jawr.12159.
- [16] D. Feng, A. Soric, and O. Boutin, “Treatment technologies and degradation pathways of glyphosate: A critical review,” *Science of the Total Environment*, vol. 742. Elsevier B.V., Nov. 10, 2020. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140559.
- [17] Y. Chen *et al.*, “Insights into the microbial degradation and resistance mechanisms of glyphosate,” *Environ Res*, vol. 215, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.envres.2022.114153.
- [18] Y. Chen *et al.*, “Insights into the microbial degradation and resistance mechanisms of glyphosate,” *Environ Res*, vol. 215, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.envres.2022.114153.
- [19] N. I. López *et al.*, “*Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate) producer isolated from an antarctic environment,” *Curr Microbiol*, vol. 59, no. 5, pp. 514–519, Nov. 2009, doi: 10.1007/s00284-009-9469-9.
- [20] D. Haas and C. Keel, “Regulation of Antibiotic Production in Root-Colonizing *Pseudomonas* spp. and Relevance for Biological Control of Plant Disease,” *Annual Review of Phytopathology*, vol. 41. pp. 117–153, 2003. doi: 10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656.
- [21] S. M. Swinton and B. Van Deynze, “Hoes to Herbicides: Economics of Evolving Weed Management in the United States,” *European Journal of Development Research*, vol. 29, no. 3, pp. 560–574, Jul. 2017, doi: 10.1057/s41287-017-0077-4.
- [22] C. D. Osteen and J. Fernandez-Cornejo, “Herbicide Use Trends: A Backgrounder.”
- [23] G. Dinelli, I. Marotti, A. Bonetti, P. Catizone, J. M. Urbano, and J. Barnesà, “Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain.”
- [24] H. S. Lamar Smith *et al.*, “COMMITTEE ON SCIENCE, SPACE, AND TECHNOLOGY.”
- [25] M. Y. Su Aplicación and A. María Rojano Delgado Córdoba, “PLATAFORMAS ANALÍTICAS EN PARA EL ESTUDIO DE LA RESISTENCIA-SENSIBILIDAD A HERBICIDAS QUÍMICA AGRÍCOLA Y EDAFOLOGÍA,” 2012. [Online]. Available: www.uco.es/publicaciones
- [26] S. Wang, B. Liu, D. Yuan, and J. Ma, “A simple method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in seawater matrix with high performance liquid chromatography and fluorescence detection,” *Talanta*, vol. 161, pp. 700–706, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2016.09.023.
- [27] Ramirez Fernando, “Mecanismos de resistencia de *Paspalum paniculatum* al herbicida glifosato,” *tesis*.
- [28] M. Anastassiadou *et al.*, “Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance ferric pyrophosphate,” *EFSA Journal*, vol. 18, no. 1. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, Jan. 01, 2020. doi: 10.2903/j.efsa.2020.5986.
- [29] K. Fenner, S. Canonica, L. P. Wackett, and M. Elsner, “Evaluating Pesticide Degradation in the Environment: Blind Spots and Emerging Opportunities.” [Online]. Available: www.sciencemag.org



- [30] F. Masotti, B. S. Garavaglia, N. Gottig, and J. Ottado, "Bioremediation of the herbicide glyphosate in polluted soils by plant-associated microbes," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 73. Elsevier Ltd, Jun. 01, 2023. doi: 10.1016/j.mib.2023.102290.
- [31] J. M. Garzón, J. P. Rodríguez Miranda, and C. Hernández Gómez, "Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible," *Univ Salud*, vol. 19, no. 2, p. 309, Aug. 2017, doi: 10.22267/rus.171902.93.
- [32] D. Alia and M. Albores, "DETECCIÓN DE RESIDUOS DE GLIFOSATO EN MAÍZ MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN DE SUPERFICIE AUMENTADA," 2018.
- [33] Bohórquez Vivas Dianny Jesmid, "MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO EN MATRICES AMBIENTALES DIANNY JESMID BOHÓRQUEZ VIVAS UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA," Bogotá D.C , 2020.
- [34] National Center for Biotechnology Information, "Glyphosate," PubChem Compound Summary for CID 3496.
- [35] V. G. Amelin, D. S. Bol'Shakov, and A. V. Tretiakov, "Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface water and vegetable oil by capillary zone electrophoresis," *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 67, no. 4, pp. 386–391, Apr. 2012, doi: 10.1134/S1061934812020037.
- [36] S. Bott *et al.*, "Phytotoxicity of glyphosate soil residues re-mobilised by phosphate fertilisation," *Plant Soil*, vol. 342, no. 1–2, pp. 249–263, May 2011, doi: 10.1007/s11104-010-0689-3.
- [37] Ł. Sikorski, M. Baciak, A. Beś, and B. Adomas, "The effects of glyphosate-based herbicide formulations on Lemna minor, a non-target species," *Aquatic Toxicology*, vol. 209, pp. 70–80, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.aquatox.2019.01.021.
- [38] OMS, *Clasificación recomendada por la OMS de los plaguicidas por el peligro que presentan y directrices para la clasificación 2019*. 2020. [Online]. Available: <http://apps.who.int/bookorders>.
- [39] T. J. Rose, L. van Zwieten, A. Claassens, C. Scanlan, and M. T. Rose, "Phytotoxicity of soilborne glyphosate residues is influenced by the method of phosphorus fertiliser application," *Plant Soil*, vol. 422, no. 1–2, pp. 455–465, Jan. 2018, doi: 10.1007/s11104-017-3482-8.
- [40] N. Julieta Salazar López María Lourdes Aldana Madrid, "HERBICIDA GLIFOSATO: USOS, TOXICIDAD Y REGULACIÓN GLYPHOSATE HERBICIDE: USES, TOXICITY AND REGULATION," 2011. [Online]. Available: www.beyondpesticides.org
- [41] C.-M. Liu, P. A. Mclean, C. C. Sookdeo, and F. C. Cannont, "Degradation of the Herbicide Glyphosate by Members of the Family Rhizobiaceae," 1991. [Online]. Available: <https://journals.asm.org/journal/aem>
- [42] J. Doublet, L. Mamy, and E. Barriuso, "Delayed degradation in soil of foliar herbicides glyphosate and sulcotrione previously absorbed by plants: Consequences on herbicide fate and risk assessment," *Chemosphere*, vol. 77, no. 4, pp. 582–589, 2009, doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.06.044.
- [43] J. P. K. Gill, N. Sethi, and A. Mohan, "Analysis of the glyphosate herbicide in water, soil and food using derivatising agents," *Environmental Chemistry Letters*, vol. 15, no. 1. Springer Verlag, pp. 85–100, Mar. 01, 2017. doi: 10.1007/s10311-016-0585-z.

- [44] G. M. Kishore and G. S. Jacob, "Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine intermediate.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, no. 25, pp. 12164–12168, Sep. 1987, doi: 10.1016/s0021-9258(18)45331-8.
- [45] "El, J. M. Oстера, G. Malanga, and S. Puntarulo, "AN UPDATE ON THE EFFECTS OF GLYPHOSATE ON THE OXIDATIVE STATE IN BIOLOGICAL SYSTEMS," Argentina, 2016. [Online]. Available: <http://biotecnia.ojs.escire.net>
- [46] T. V. Shushkova *et al.*, "Glyphosate acetylation as a specific trait of *Achromobacter* sp. Kg 16 physiology," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 100, no. 2, pp. 847–855, Jan. 2016, doi: 10.1007/s00253-015-7084-1.
- [47] G. S. Jacob, J. R. Garbow, L. E. Hallas, N. M. Kimack, G. M. Kishore, and J. Schaefer', "Metabolism of Glyphosate in *Pseudomonas* sp. Strain LBr," 1988.
- [48] A. V. Sviridov, T. V. Shushkova, I. T. Ermakova, E. V. Ivanova, and A. A. Leontievsky, "Glyphosate: Safety risks, biodegradation, and bioremediation," in *Current Environmental Issues and Challenges*, Springer Netherlands, 2014, pp. 183–195. doi: 10.1007/978-94-017-8777-2_11.
- [49] H. Zhan, Y. Feng, X. Fan, and S. Chen, "Recent advances in glyphosate biodegradation," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 102, no. 12. Springer Verlag, pp. 5033–5043, Jun. 01, 2018. doi: 10.1007/s00253-018-9035-0.
- [50] A. Yarith and G. Velandia, "ALTERNATIVAS DE SOLUCIÓN PARA LA AFECTACIÓN AMBIENTAL POR EL USO DEL GLIFOSATO EN COLOMBIA."
- [51] R. Martinelli *et al.*, "Glyphosate excessive use chronically disrupts the shikimate pathway and can affect photosynthesis and yield in citrus trees," *Chemosphere*, vol. 308, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.136468.
- [52] J. An *et al.*, "Photodegradation of glyphosate in water and stimulation of by-products on algae growth," *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 263, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.115211.
- [53] R. Mesnage and M. N. Antoniou, "Computational modelling provides insight into the effects of glyphosate on the shikimate pathway in the human gut microbiome," *Curr Res Toxicol*, vol. 1, pp. 25–33, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.crttox.2020.04.001.
- [54] M. Mulet, M. Gomila, C. Scotta, D. Sánchez, J. Lalucat, and E. García-Valdés, "Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus *Pseudomonas*," *Syst Appl Microbiol*, vol. 35, no. 7, pp. 455–464, 2012, doi: 10.1016/j.syapm.2012.08.007.
- [55] "Systematic Bacteriology Second Edition Volume Four."
- [56] Alfredo, "Iapsus Medicus." [Online]. Available: www.the-icsp.org
- [57] Lidia Ruiz Martinez, "Pseudomonas aeruginosa: APORTACIÓN AL CONOCIMIENTO DE SU ESTRUCTURA Y AL DE LOS MECANISMOS QUE CONTRIBUYEN A SU RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS LÍDIA RUIZ MARTÍNEZ Barcelona, Noviembre 2007," Universidad de Barcelona, Barcelona, 2007.
- [58] M. W. Silby, C. Winstanley, S. A. C. Godfrey, S. B. Levy, and R. W. Jackson, "Pseudomonas genomes: Diverse and adaptable," *FEMS Microbiol Rev*, vol. 35, no. 4, pp. 652–680, Jul. 2011, doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x.
- [59] P. M. Tribelli *et al.*, "Microaerophilic alkane degradation in *Pseudomonas extremaustralis*: a transcriptomic and physiological approach," *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 45, no. 1, pp. 15–23, Jan. 2018, doi: 10.1007/s10295-017-1987-z.

- [60] L. J. Raiger Iustman, P. M. Tribelli, J. G. Ibarra, M. V. Catone, E. C. Solar Venero, and N. I. López, “Genome sequence analysis of *Pseudomonas extremaustralis* provides new insights into environmental adaptability and extreme conditions resistance,” *Extremophiles*, vol. 19, no. 1, pp. 207–220, Jan. 2015, doi: 10.1007/s00792-014-0700-7.
- [61] P. M. Tribelli *et al.*, “Novel essential role of ethanol oxidation genes at low temperature revealed by transcriptome analysis in the antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*,” *PLoS One*, vol. 10, no. 12, Dec. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0145353.
- [62] P. M. Tribelli *et al.*, “Core regulon of the global anaerobic regulator Anr targets central metabolism functions in *Pseudomonas* species,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-45541-0.
- [63] P. M. Tribelli, C. Di Martino, N. I. López, and L. J. Raiger Iustman, “Biofilm lifestyle enhances diesel bioremediation and biosurfactant production in the Antarctic polyhydroxyalkanoate producer *Pseudomonas extremaustralis*,” *Biodegradation*, vol. 23, no. 5, pp. 645–651, Sep. 2012, doi: 10.1007/s10532-012-9540-2.
- [64] P. M. Tribelli, B. S. Méndez, and N. I. López, “Oxygen-sensitive global regulator, *anr*, is involved in the biosynthesis of poly(3-Hydroxybutyrate) in *Pseudomonas extremaustralis*,” *J Mol Microbiol Biotechnol*, vol. 19, no. 4, pp. 180–188, Jan. 2011, doi: 10.1159/000320261.
- [65] P. M. Tribelli *et al.*, “Genome sequence of the polyhydroxybutyrate producer *Pseudomonas extremaustralis*, a highly stress-resistant antarctic bacterium,” *Journal of Bacteriology*, vol. 194, no. 9, pp. 2381–2382, May 2012. doi: 10.1128/JB.00172-12.
- [66] A. Vargas-Ordóñez, I. Aguilar-Romero, J. Villaverde, F. Madrid, and E. Morillo, “Isolation of Novel Bacterial Strains *Pseudomonas extremaustralis* CSW01 and *Stutzerimonas stutzeri* CSW02 from Sewage Sludge for Paracetamol Biodegradation,” *Microorganisms*, vol. 11, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.3390/microorganisms11010196.
- [67] N. D. Ayub, P. M. Tribelli, and N. I. López, “Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation,” *Extremophiles*, vol. 13, no. 1, pp. 59–66, Jan. 2009, doi: 10.1007/s00792-008-0197-z.
- [68] C. De and B. Genómica, “INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL,” México, 2019.
- [69] Y. Barrios and S. Martín, “Bioremediation: a tool for the management of oil pollution in marine ecosystems,” *la Habana Cuba*. [Online]. Available: www.npr.org/templates/story/story.
- [70] V. Andreu and Y. Picó, “Determination of pesticides and their degradation products in soil: Critical review and comparison of methods,” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 23, no. 10–11, pp. 772–789, 2004, doi: 10.1016/j.trac.2004.07.008.
- [71] N. Sethunathan~ and T. Yoshida, “A Flavobacterium sp. that degrades diazinon and parathion1.” [Online]. Available: www.nrcresearchpress.com
- [72] L. Yao *et al.*, “Degradation of the herbicide dicamba by two sphingomonads via different O-demethylation mechanisms,” *Int Biodeterior Biodegradation*, vol. 104, pp. 324–332, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.ibiod.2015.06.016.
- [73] W. Zhang, A. M. Asiri, D. Liu, D. Du, and Y. Lin, “Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents,” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 54. Elsevier B.V., pp. 1–10, 2014. doi: 10.1016/j.trac.2013.10.007.

- [74] A. E. S. A. Ishag, A. O. Abdelbagi, A. M. A. Hammad, E. A. E. Elsheikh, O. E. Elsarai, and J. H. Hur, "Biodegradation of endosulfan and pendimethalin by three strains of bacteria isolated from pesticides-polluted soils in the Sudan," *Appl Biol Chem*, vol. 60, no. 3, pp. 287–297, Jun. 2017, doi: 10.1007/s13765-017-0281-0.
- [75] D. Y. Zhang, W. G. Li, X. J. Gong, and P. Wang, "Ammonium removal from drinking water by *Acinetobacter* sp. SFA 10 at low temperature *." [Online]. Available: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [76] S. Pailan, K. Sengupta, U. Ganguly, and P. Saha, "Evidence of biodegradation of chlorpyrifos by a newly isolated heavy metal-tolerant bacterium *Acinetobacter* sp. strain MemC14," *Environ Earth Sci*, vol. 75, no. 12, Jun. 2016, doi: 10.1007/s12665-016-5834-8.
- [77] M. A. Rogel-Hernandez *et al.*, "Genome Sequence of *Acinetobacter lactucae* OTEC-02, Isolated from Hydrocarbon-Contaminated Soil," 2017, doi: 10.1128/genomeA.
- [78] M. Eddleston, N. A. Buckley, P. Eyer, A. H. Dawson, and W. Straub, "Management of acute organophosphorus pesticide poisoning," *www.thelancet.com*, p. 597, doi: 10.1016/S0140.
- [79] D. Feng, A. Soric, and O. Boutin, "Treatment technologies and degradation pathways of glyphosate: A critical review," *Science of the Total Environment*, vol. 742. Elsevier B.V., Nov. 10, 2020. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140559.
- [80] M. Manogaran, M. Y. Shukor, N. A. Yasid, W. L. W. Johari, and S. A. Ahmad, "Isolation and characterisation of glyphosate-degrading bacteria isolated from local soils in Malaysia," *Rendiconti Lincei*, vol. 28, no. 3, pp. 471–479, Sep. 2017, doi: 10.1007/s12210-017-0620-4.
- [81] Y. Chen *et al.*, "Insights into the microbial degradation and resistance mechanisms of glyphosate," *Environ Res*, vol. 215, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.envres.2022.114153.
- [82] WIPO, "Patentes," <https://patentscope.wipo.int/search/en/search.jsf?jsessionid=9D867FA283B4FDDDF5C5F34F75103987C.wapp1>.
- [83] T. Voss, A. S. Paranjpe, T. G. Cook, and N. D. W. Garrison, "A Short Introduction to Intellectual Property Rights," *Tech Vasc Interv Radiol*, vol. 20, no. 2, pp. 116–120, Jun. 2017, doi: 10.1053/j.tvir.2017.04.007.
- [84] George Elliott, "Basics of US Patents and the Patent System," United States Patent and Trademark Office, Jul. 2007. [Online]. Available: <http://www.aapsj.org>
- [85] A. Murphy, M. Stramiello, S. Lewis, and T. Irving, "Introduction to intellectual property: A U.S. perspective," *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 5, no. 8, Aug. 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a020776.
- [86] A. Arora, W. M. Cohen, H. Lee, and D. Sebastian, "NBER WORKING PAPER SERIES INVENTION VALUE, INVENTIVE CAPABILITY AND THE LARGE FIRM ADVANTAGE," 2022. [Online]. Available: <http://www.nber.org/papers/w30354>
- [87] C. Brunel and T. Zylkin, "Do cross-border patents promote trade?," *Canadian Journal of Economics*, vol. 55, no. 1, pp. 379–418, Feb. 2022, doi: 10.1111/caje.12577.
- [88] Organización Mundial de la Propiedad Intelectual, "OMPI," <https://www.wipo.int/patents/es/>.
- [89] Rosemary Elaine DickJohn QuinnSarah Bronwen ReesWolfgang Walter Schuch, "Glyphosate degrading bacteria," WO1992019719A1, Nov. 12, 1992



- [90] Z. W. W. M. Z. Y. B. Y. L. H. Zhang Duoying, "The pseudomonad and its application of organophosphorus pesticide and nitrate in low temperature underground water are removed simultaneously," CN109706099A, May 03, 2019
- [91] Shandong Feed Veterinary Drug Quality Inspection Center Shandong Yisheng Livestock & Poultry Breeding Co ltd, "Patente Bacteria degradante del glifosato y aplicación de la mismas.," 2021
- [92] Elvis Neiser Manco Méndez, "Las patentes y sus importancia en la Investigación Científica," San Borda -Lima. Perú, Aug. 2017.
- [93] I. Cockburn and G. Long, "The importance of patents to innovation: Updated cross-industry comparisons with biopharmaceuticals," *Expert Opin Ther Pat*, vol. 25, no. 7, pp. 739–742, Jul. 2015, doi: 10.1517/13543776.2015.1040762.
- [94] S. V. Kononova and M. A. Nesmeyanova, "Phosphonates and their degradation by microorganisms".
- [95] V. Job, G. L. Marcone, M. S. Piloni, and L. Pollegioni, "Glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. Characterization of a new flavoprotein," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 9, pp. 6985–6993, Mar. 2002, doi: 10.1074/jbc.M111095200.
- [96] Y. Qin *et al.*, "Engineered glyphosate oxidase coupled to spore-based chemiluminescence system for glyphosate detection," *Anal Chim Acta*, vol. 1133, pp. 39–47, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.aca.2020.07.077.
- [97] S. S. Kamat, H. J. Williams, and F. M. Raushel, "Intermediates in the transformation of phosphonates to phosphate by bacteria," *Nature*, vol. 480, no. 7378, pp. 570–573, Dec. 2011, doi: 10.1038/nature10622.
- [98] S. S. Kamat, H. J. Williams, and F. M. Raushel, "Intermediates in the transformation of phosphonates to phosphate by bacteria," *Nature*, vol. 480, no. 7378, pp. 570–573, Dec. 2011, doi: 10.1038/nature10622.
- [99] S. M. He *et al.*, "Structure and mechanism of PhnP, a phosphodiesterase of the carbon-phosphorus lyase pathway," *Biochemistry*, vol. 50, no. 40, pp. 8603–8615, Oct. 2011, doi: 10.1021/bi2005398.
- [100] M. Kunitz, "CRYSTALLINE INORGANIC PYROPHOSPHATASE ISOLATED FROM BAKER'S YEAST*."
- [101] J. Santos, "Colección Colección: LAS CIENCIAS NATURALES Y LA MATEMÁTICA LAS CIENCIAS NATURALES Y LA MATEMÁTICA P R O T E Í N A S Estructuras fascinantes," 2010.
- [102] N. E. Holden, "INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY," 1979.
- [103] M. A. Andrade, S. I. Â O, and B. Rost, "Adaptation of Protein Surfaces to Subcellular Location."
- [104] T. K. Mohanta, A. Khan, A. Hashem, E. F. Abdallah, and A. Al-Harrasi, "The molecular mass and isoelectric point of plant proteomes," *BMC Genomics*, vol. 20, no. 1, Aug. 2019, doi: 10.1186/s12864-019-5983-8.
- [105] T. K. Mohanta, M. S. Kamran, M. Omar, W. Anwar, and G. S. Choi, "PlantMWpIDB: a database for the molecular weight and isoelectric points of the plant proteomes," *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-11077-z.
- [106] S. Romero Romero, D. A. Fernández Velasco, and M. Costas, "Estabilidad termodinámica de proteínas," *Educación Química*, vol. 29, no. 3, p. 3, Aug. 2018, doi: 10.22201/fq.18708404e.2018.3.64699.

- [107] B. Dutta, A. Banerjee, P. Chakraborty, and R. Bandopadhyay, “In silico studies on bacterial xylanase enzyme: Structural and functional insight,” *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, vol. 16, no. 2, pp. 749–756, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.jgeb.2018.05.003.
- [108] J. Kyte and R. F. Doolittle, “A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein,” 1982.
- [109] published by Dove Press, “Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry Evaluating the efficacy of a structure-derived amino acid substitution matrix in detecting protein homologs by BLAST and PSI-BLAST nalin CW Goonesekere,” 2009. [Online]. Available: <https://www.dovepress.com/>
- [110] M. Jaimes Melo and C. DE Biología Bogotá Dc, “PREDICCIÓN IN-SILICO DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA HIPOTÉTICA p284 DE Trypanosoma cruzi,” 2012.
- [111] P. Y. Crou and G. D. Fasiwant, “Structural and Functional Role of Leucine Residues in Proteins,” 1973.
- [112] D. M. Engelman, T. A. Steitz, and A. Goldman, “IDENTIFYING NONPOLAR TRANSBILAYER HELICES IN AMINO ACID SEQUENCES OF MEMBRANE PROTEINS,” 1986. [Online]. Available: www.annualreviews.org
- [113] D. Teixeira de Almeida, M. L. Santaolara Ayora, and E. Alonso Iglesias, “La arginina en su contexto metabólico y fisiológico,” *Acta bioquím. clín. latinoam*, pp. 165–179, 2003.
- [114] W. L. Marshall, “Hydrothermal synthesis of amino acids,” 1994.
- [115] T. J. Narwani *et al.*, “Bioinformatics protein flexibility prediction 1 in silico prediction of protein flexibility with local structure approach,” 2019.
- [116] J. C. Hall, “Review Glycine,” 2015.
- [117] C. H. Kang *et al.*, “Structural and biochemical characterization of iminodiacetate oxidase from *Chelativorans* sp. BNC1,” *Mol Microbiol*, vol. 112, no. 6, pp. 1863–1874, Dec. 2019, doi: 10.1111/mmi.14399.
- [118] Z. Xiang, “Advances in Homology Protein Structure Modeling,” 2006. [Online]. Available: <http://www.rscb.org>
- [119] H. Sáenz-Suárez, L. R. Lareo, C. Oribio-Quinto, J. Martínez-Mendoza, and A. Chávez-Zobel, “Redalyc.Predicción computacional de estructura terciaria de las proteínas humanas Hsp27, aB-cristalina y HspB8,” 2011. [Online]. Available: www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum