

DISEÑO RACIONAL DE UN MECANISMO EN *Bacillus subtilis* PARA LA DEGRADACIÓN *in situ* DE GLIFOSATO EMPLEANDO CLONACIÓN MODULAR

Roberto Olvera-Hernández, Ximena De Unánue-Gutiérrez, Alejandro Arana-Sánchez, Oscar A. Rojas-Rejón, Alejandro Torres-Haro. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO), Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales. Tlaquepaque, Jalisco, México; CP. 45604. ib721045@iteso.mx

Palabras clave: Glifosato, degradación, clonación modular, biología sintética, *Bacillus subtilis*

Introducción. En México, entre el 20-30% de la producción agrícola anual es afectada por plagas [1], siendo necesario el uso de glifosato. Sin embargo, representa un potencial riesgo para la salud humana y ambiental [2,3]. Existen microorganismos que contienen la maquinaria metabólica para su degradación [3]. No obstante, la liberación de estos sistemas biológicos al ambiente podría representar otros desequilibrios ecológicos por su potencial patagénico. Por eso, soluciones basadas en biología sintética comienzan a generar un gran interés dentro del campo de la biorremediación.

En el presente trabajo, se realizó el diseño racional de un mecanismo ortólogo específico para *B. subtilis* por medio del ensamble GoldenGate/MoClo para la biorremediación *in situ* de glifosato.

Metodología. Un *cassette* sintético de tres unidades transcripcionales fue diseñado (Figura 1a) con GoldenGate/MoClo [4]. Posteriormente, las secuencias se cargaron a la plataforma *Benchling* para su procesamiento *in silico*. El complejo Glifosato oxidorreductasa (GOX)/SpyTag [5] de DEG02 fue modelado en *AlphaFold2* (Figura 2b) para comprobar su integridad y su afinidad al glifosato en *SwissDock* (Figura 2c).

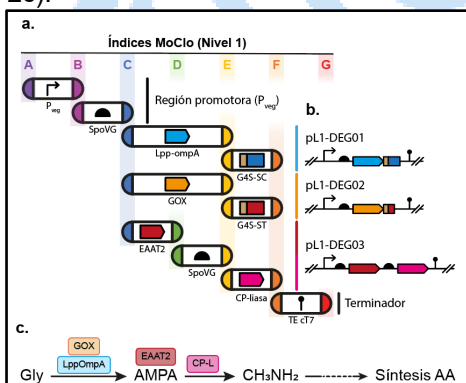


Fig. 1. a) Las partes requeridas para la ruta de degradación fueron recuperadas de GenBank, iGEM Part Registry y literatura [5], y son asignados los índices de ensamble correspondientes. b) El *cassette* consiste en 3 unidades transcripcionales constitutivas: DEG01 (complejo Lpp-ompA/SpyCatcher [5]); DEG02 (complejo GOX/SpyTag [5]), y DEG03 (EAAT2 y CP-liasa). c) Mecanismo enzimático de degradación diseñado.

Resultados. El diseño realizado del *cassette* modular que contiene las secuencias de los módulos DEG01 a DEG03 para su posterior expresión en *B. subtilis* y los modelos 3D de DEG02 se muestran en la Figura 2.

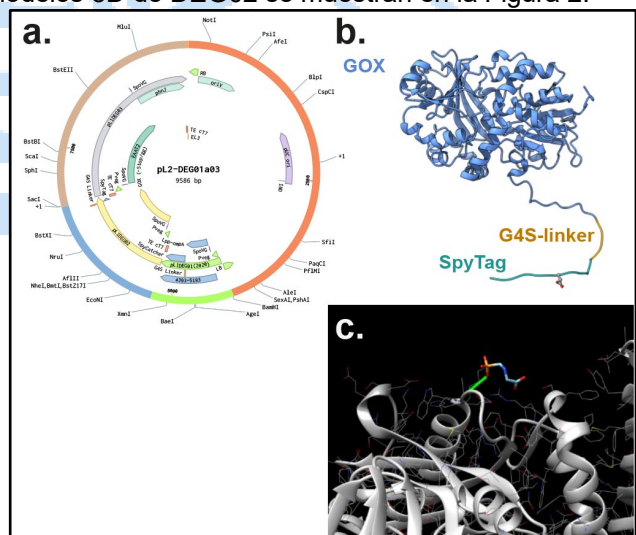


Fig. 2. a) Vector pL2-DEG01-03 (Nivel II) ensamblado con GoldenGate/MoClo para su posterior inserción en *B. subtilis* para la degradación de glifosato. b) Predicciones 3D del módulo DEG02 (ChimeraX); c) Acoplamiento del glifosato al complejo DEG01-02 (GOX; ChimeraX).

Conclusiones. La biología sintética genera alternativas para la biorremediación de contaminantes *in situ* empleando microorganismos no-patógenos como *Bacillus subtilis*.

Agradecimientos: A la Dra. Mariana Delgado-García (ITSM-Guadalajara) por asesoría técnica.

Bibliografía.

- [1] M. F. Villareal-Delgado, E. D. Villa-Rodríguez, L. A. Cirachávez, M. I. Estrada-Alvarado, F. I. Parra-Cota and S. Santos-Villalobos, SciELO, vol. 36, no. 1, 2018.
- [2] CONACYT, Gobierno de México, 2022.
- [3] E. Vidal, Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas, Universidad Nacional del Litoral, 2014.
- [4] E. Weber, C. Engler, R. Gruetzner, S. Werner, y S. Marillonnet, PLoS ONE, vol. 6, no. 2. Public Library of Science (PLoS), p. e16765, 2011.
- [5] S. Gallus, T. Peschke, M. Paulsen, T. Burgahn, C. M. Niemeyer, y K. S. Rabe, ChemBioChem, vol. 21, no. 15. Wiley, pp. 2126–2131, 2020.