



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE BIOLOGÍA

TÍTULO DE LA TESIS

**Evaluación de la capacidad de *Pseudomonas putida* KT2440 para
tolerar y degradar agroquímicos e hidrocarburos**

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO (A) EN BIÓLOGIA

PRESENTA:

VERONICA DIONICIO HERNÁNDEZ

DIRECTOR (A): DALIA MOLINA ROMERO
CO-DIRECTOR: ANTONINO BAEZ ROGELIO

ABRIL 2024



TABLA DE ABREVIATURAS

°C	Centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitros
kpb	Kilo pares de bases
nm	nanómetros
pH	Potencial de hidrógeno
mL	Mililitros
mM	Milimolar
UFC	Unidades formadoras de colonias

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Vías de exposición en un entorno doméstico, debido a la contaminación del suelo.	4
2	Principales vías de degradación del compuesto 2,4 D mediante reacciones metabólicas.	5
3	Metabolismo de <i>P. putida</i> KT2440 de glucosa, fructosa y benzoato mediante la vía de Entner-Doudoroff (ED), la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y la vía del β -cetoadipato.	10
4	Barrido espectrofotométrico UV-Vis del M9 fuente de carbono Diésel 1%.	18
5	Barrido espectrofotométrico UV-Vis del M9 fuente de carbono Gasolina 1%.	18
6	Barrido espectrofotométrico UV-Vis del M9 fuente de carbono Humimax Plus 1%.	19
7	Barrido espectrofotométrico UV-Vis del M9 fuente de carbono Desmonte 4EB 1%.	19
8	Curva de calibración del diésel.	20
9	Curva de calibración de la gasolina.	20
10	Gráfica de crecimiento bacteriano con hidrocarburos y agroquímicos como fuente de carbono al 1%.	23
11	Resultados de prueba de normalidad de Log_{10} UFC/mL al 1%.	24
12	Diferencias de las medidas para Log_{10} UFC/mL al 1%.	26
13	Gráfica de crecimiento bacteriano con los hidrocarburos y herbicidas al 4%.	27
14	Resultados de prueba de normalidad de Log_{10} UFC/mL.	28
15	Grafica de comparación de medias utilizando los tratamientos al 4%.	29
16	Diferencias de las medidas para Log_{10} UFC/mL al 4%.	31
17	Comparación del crecimiento bacteriano en hidrocarburos.	32
18	Comparación del crecimiento bacteriano en hidrocarburos.	32
19	Comparación del crecimiento bacteriano con agroquímicos.	33
20	Comparación del crecimiento bacteriano con agroquímicos.	34
21	Curva de degradación de las diferentes fuentes de carbono en relación con el tiempo	35
22	Cromatografía de gases masa con fuente de carbono Diésel al 4%.	36
23	Cromatografía de gases masa con fuente de carbono de gasolina al 4%	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1		Página
1	Resultados del análisis de MANOVA del experimento al 1% (v/v).	25
2	Resultados del análisis de las medias por grupos mediante la prueba de Tukey: cultivos con 1% de fuente de carbono	25
3	Resultados desglosados del análisis de medias por grupo mediante la prueba de Tukey	26
4	Resultados del análisis de MANOVA al 4%	28
5	Resultados del análisis de la prueba de Tukey: Tratamientos al 1%	30
6	Resultados desglosados del análisis de la prueba de Tukey	30

AGRADECIMIENTOS

A MI MADRE:

Clementina por darme apoyo incondicional y estar presente en cada momento de mi vida, por darme la oportunidad de conseguir mis sueños, por siempre motivarme a superarme, por nunca dejarme sola. Te amo Mamá.

A MI PAREJA:

Alejandro, te agradezco con todo el corazón tu cariño, tiempo, dedicación, cuidado y apoyo, aunque siempre faltaran palabras para describir todo lo que me has dado. No importa a donde nos lleve la vida, jamás olvidare como lograste traducir mi espíritu, como fuimos transparentes, ni como nos nacía tanto amor.

A MI PADRE:

Tomas por darme apoyo incondicional durante mi vida, por siempre ver por mi bienestar, por intentar ayudarme en cada proyecto que tenía. Te amo Papá

A MIS AMIGOS:

A Reyna y Estefanía por estar ahí incondicionalmente, apoyándome no solo en los momentos agradables sino también en los personales, gracias por seguirme motivando a crecer, espero que las 3 seamos siempre así de unidas.

A MI DIRECTORA:

Doctora Dalia, quien me mostró el mundo de la investigación, quien alentó mi curiosidad para buscar respuestas donde aún no las hay, gracias por orientarme y darme la oportunidad de explorar mi potencial, sin usted no hubiera imaginado las cosas tan maravillosas que existen en la Microbiología.

A MI CODIRECTOR:

Doctor Antonino, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por mostrarme las aplicaciones biotecnológicas que poseen los microorganismos, por orientar mi vida profesional, así como por la excelente dirección de tesis, el tiempo otorgado, la paciencia, las enseñanzas, las experiencias compartidas.

Contenido

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	6
Características generales del modelo de biorremediación microbiana (<i>Pseudomonas putida</i> KT2440)	8
Información taxonómica	8
Genoma	8
Hábitat.....	8
Características morfológicas.....	9
Metabolismo	9
ANTECEDENTES.....	11
JUSTIFICACIÓN.....	14
HIPÓTESIS	14
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	14
OBJETIVO GENERAL	15
Objetivos específicos	15
MATERIAL Y MÉTODOS	15
Microorganismo	15
Medios de cultivo	15
Tratamientos utilizados	16
Condiciones generales de cultivo	16
Técnicas microbiológicas	17
Curvas de crecimiento en presencia de diferentes fuentes de carbono	17
Barrido espectrofotométrico de las muestras de M9 con hidrocarburo y herbicida	17
Curvas de calibración	20
Análisis por Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de Masa (CG-EM) del cultivo al 4% de gasolina y diésel	21
Condiciones de CG-EM.....	21
Análisis estadístico	22
RESULTADOS.....	22
Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2440 en M9 con hidrocarburos y agroquímicos al 1%	22
Prueba de normalidad de los valores de Log ₁₀ UFC/mL para cada uno de los tratamientos cuando los hidrocarburos y agroquímicos están al 1%.....	23
Prueba de MANOVA de los valores de Log ₁₀ UFC/mL agrupados por fuente de carbono o por el tiempo de la medición cuando los hidrocarburos y agroquímicos están al 1%. 24	
Comparación de medias de Log ₁₀ UFC/mL por grupos mediante la Prueba de Tukey..	25

Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2440 en medio M9 con hidrocarburos y agroquímicos al 4%	27
Prueba de normalidad de los valores de Log ₁₀ UFC/mL para cada uno de los tratamientos cuando los hidrocarburos y agroquímicos están al 4%	28
Comparación de medias de Log ₁₀ UFC/mL por grupos mediante la prueba de Tukey ..	29
Discusión	38
Conclusiones.....	41
Perspectivas.....	42
BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXO 1	53
ANEXO 2	54

RESUMEN

La palabra xenobiótico deriva del griego y significa “foráneo a la vida”, estos compuestos generan efectos tóxicos en la mayoría de los organismos, incluido el hombre. Uno de los xenobióticos más utilizado por el hombre y que genera problemas ambientales por su mal manejo es el petróleo; en las últimas décadas se han registrado varios derrames de petróleo, por consiguiente, se han buscado nuevas técnicas de limpieza. Otro xenobiótico importante son los agroquímicos, su uso excesivo origina problemas de salinización de suelos y contaminación en mantos acuíferos. En este trabajo se evaluó la capacidad de tolerancia y/o degradación que posee *Pseudomonas putida* KT2440 ante la presencia de compuestos xenobióticos de tipo hidrocarburo y agroquímicos. En periodos de incubación de 72 h con una baja concentración (1%), *P. putida* KT2440 fue capaz de crecer en diésel alcanzando poblaciones de 7.09 Log₁₀ UFC/mL, en gasolina alcanzó 6.13 Log₁₀ UFC/mL y 5.8 Log₁₀ UFC/mL en Humimax; en todos los casos iniciando con una población de 4.4-4.8 Log₁₀ UFC/mL. Sin embargo, el herbicida Desmonte 4EB resultó tóxico al 1 y 4 %, esto debido al compuesto activo 2,4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) el cual no puede utilizar como fuente de carbono, aunque se ha reportado que la bacteria es capaz de degradar otros compuestos organofosforados. *P. putida* KT2440 creció en Humimax al 1%, este resultado se puede justificar debido a que la bacteria al ser saprofita puede consumir el compuesto activo de este xenobiótico (ácidos húmicos). En cuanto a la degradación de los hidrocarburos al 1%, se observó que *P. putida* KT2440 fue capaz de degradar un 58.8 % de la gasolina determinado mediante espectrofotometría. Adicionalmente, se identificaron 6 posibles aromáticos que *P. putida* KT2440 fue capaz de degradar en los tratamientos con diésel al 4% mediante el análisis por cromatografía de gases masa, y los componentes que la bacteria posiblemente degradó fueron: o-xileno, 1,3 - dimetil-benceno, 1- etil-3 metil benceno, 1, 2,4 -trimetil benceno, 2-etil-1,4-dimetil benceno y el compuesto 2-etil-1,4-dimetil benceno.

INTRODUCCIÓN

La palabra xenobiótico deriva del griego y significa “foráneo a la vida” (Biancucci, 2007). Su origen natural son compuestos químicos como: metabolitos de plantas, toxinas animales, hidrocarburos naturales, entre otros (Méndez *et al.*, 2008). Algunos de estos compuestos se pueden considerar benéficos, ya que contribuyen a la salud, como lo son los anticonvulsivos (isoenzimas CYP (citocromo) extrahepáticas) (Palomo *et al.*, 2007). Por otro lado, tienen una mayor incidencia en el ambiente por su origen antropológico, que incluye compuestos provenientes de fábricas de plásticos, crema dental, detergentes, colorantes, teléfonos celulares, desechos del lavado de carros, zapatos, plantas de tratamiento de aguas residuales, entre otros procesos (González, 2017; Montenegro, 2018). Los xenobióticos tienen efectos negativos en humanos y animales, provocan anomalías neonatales, postnatales, y también pueden disminuir la capacidad reproductiva. Estos compuestos sintéticos son bloqueadores en la fisiología de algunos órganos, como lo es el sistema endocrino (Méndez *et al.*, 2008) En plantas, los xenobióticos producen interferencias en procesos fisiológicos como: absorción de nutrientes y/o agua, fotosíntesis, etcétera (Salame *et al.*, 2010).

Dentro de los compuestos xenobióticos se encuentra el petróleo. En las últimas décadas, se han registrado derrames petroleros en diversos ecosistemas, por lo que se ha convertido en un problema ambiental (Tang *et al.*, 2011). Los hidrocarburos de petróleo crudo se pueden dividir en:

- Los hidrocarburos alifáticos (HA): Incluyen alcanos, alquinos y cicloalcano. Los HA son compuestos orgánicos no derivados del benceno y se componen de moléculas de carbono e hidrógeno, formando cadenas, que pueden ser abiertas o cerradas. Los HA también se conocen como hidrocarburos saturados alifáticos, que son responsables de la fórmula general de C_nH_{2n+2} , y su estructura química es constituida por enlaces simples de carbono- carbono y carbono-hidrógeno (Congiu, 2013).
- Hidrocarburos aromáticos: En esta categoría contiene a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), cuya composición incluye moléculas de benceno y son originados principalmente por la combustión incompleta o por pirólisis de materia orgánica como el aceite, carbón, madera y tabaco

(Raclavská *et al.*, 2018). Los HAP se distribuyen de manera natural en el ambiente e incluso son bioacumulados por los organismos, sin embargo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos contribuyen a la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), provocando la oxidación del ADN, en consecuencia, tienen efectos cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos en los organismos, y en los seres humanos puede causar hemotoxicidad (Kim, 2013). La alta hidrofobicidad es una característica fisicoquímica muy importante de los HAP, ya que aumenta cuanto mayor sea el número de anillos, con lo que tiene tendencia a adsorberse a las superficies, dificultando su biodegradación.

Uno de los derivados de petróleo es la gasolina, la cual es una mezcla completa de hidrocarburos de entre 4 y 12 átomos de carbono, que está en fase líquida, presentando alta volatilidad. La gasolina es obtenida en el intervalo entre 30 y 200 °C de la temperatura de la destilación. Su estructura está constituida por hidrocarburos de cadena lineal (parafinas) (7%- 9%), isoparafinas o hidrocarburos ramificados (38% - 39%), compuestos aromáticos (43% - 44%) naftenos (3% - 4%) y olefinas (5% - 6%) (Juárez *et al.*, 2020).

El diésel al igual que la gasolina es un derivado del petróleo, que es obtenido en la fracción de destilación de los 270 a 300 °C, y está compuesto por compuestos parafínicos, naftalénicos y aromáticos, con una cadena de carbonos entre C₁₀ y C₂₂; este derivado es considerado como un hidrocarburo de fracción media (Suárez, 2015). La fórmula química del diésel es la siguiente: C₁₂H₂₃ (Téllez *et al.*, 2013).

Otra sustancia que también se encuentra dentro de los compuestos xenobióticos, son los herbicidas. Los cuales son componentes químicos tóxicos utilizados para eliminar o neutralizar plantas indeseadas (malezas o mala hierba). Estas malezas compiten por los recursos disponibles (agua, luz y nutrientes) contra los cultivos (Rose *et al.*, 2016). Con normalidad se utilizan en la agricultura, pero también se usan contra las malas hierbas en entornos urbanos (campos deportivos, vías férreas y demás) (Duke & Dayan, 2018). Aunque se registran efectos positivos en la agricultura, estos herbicidas causan impactos negativos en el medio ambiente, debido a la alta persistencia y toxicidad que generan a la mayoría de los organismos y microorganismos en el ambiente (Bautista, 2017; Qu *et al.*, 2021).

De acuerdo a Caramutti (2019) los herbicidas se pueden clasificar en base a estas características:

- Persistencia: Grado de residualidad que determina el tiempo que perdura el efecto del herbicida posterior a su aplicación.
- Movilidad dentro de la planta:
 - Sistémicos: se absorben y se translocan a través del floema a otras zonas de la planta. Así, pueden actuar sobre zonas diferentes a las aplicadas.
 - De contacto: solo operan sobre las zonas de la planta en que son aplicados.
- Selectividad:
 - Selectivos: atacan a las familias de malezas para los que fueron diseñados.
 - No selectivos: eliminan un amplio espectro de plantas. También se denominan herbicidas totales.
- Zona de actuación:
 - Sobre suelo: Se absorben por las raíces de la planta.
 - Foliculares: Se absorben por los tejidos de la planta expuestos encima del suelo.
- Según el momento de aplicación:
 - Pre-siembra: se aplican antes de la siembra.
 - Pre-emergentes: Se aplican antes de la germinación o emergencia del cultivo.
 - Post-emergentes: Se aplican una vez que el cultivo superó su etapa inicial de germinación.

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es uno de los principales activos más utilizados para la formulación de varios herbicidas comerciales, como es el caso del herbicida Desmonte 4EB®. El 2,4 D es un compuesto de tipo hormonal, el cual combate malezas de hoja ancha (dicotiledóneas) (Akintui *et al.*, 2015). Se aplica como pre-emergente en los cultivos para limpiar el barbecho al momento de sembrar, si se aplica directo al cultivo afectaría el crecimiento de la planta, porque actúa como una hormona vegetal, causando un crecimiento incontrolado de los tejidos meristémicos, inhibiendo la síntesis de ADN y proteínas; esta aplicación se realiza en cultivos como maíz o soja (De Jesús, 2018). En cambio, para cereales como el trigo, la selectividad del 2,4-D no afecta a la planta, por ende, puede utilizarse como post-emergente para eliminar malezas que crecen con el cultivo. La baja adhesión al suelo del 2,4-D se debe al coeficiente agua-octanol ($K_{oc} = 60$), lo cual favorece su aparición en aguas subterráneas (Velarde, 2001).

Es importante mencionar que en los últimos años el uso indiscriminado de herbicidas tuvo como consecuencia la alteración de la calidad de los alimentos, junto con sus características fisicoquímicas y organolépticas. Así mismo, los herbicidas producen enfermedades en los seres humanos como carcinogénesis, teratogénesis e incluso efectos sobre el sistema endócrino, además de aumentar la oxidación de los ácidos grasos y afectar las células hepáticas (Ancayay, 2022). Por lo tanto, la contaminación química por los desechos agrotóxicos en los alimentos, el agua y el aire es una preocupación para la población y para los ecosistemas (Bautista, 2017) **(Figura 1)**.

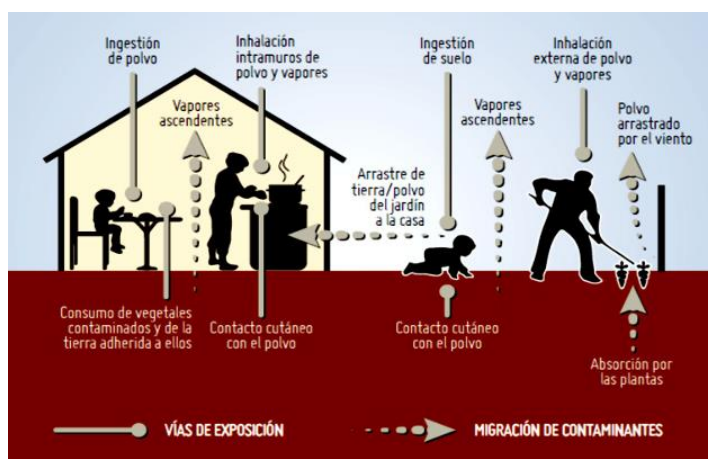


Figura 1. Algunas vías de exposición a contaminantes en un entorno doméstico, debido a la contaminación del suelo. Tomada de Rodríguez Eugenio y sus colaboradores (2019).

Aunque actualmente no se conoce el mecanismo para la degradación del compuesto 2,4 – D. Walters en 1999 presenta una propuesta de los posibles procesos por los cuales el 2, 4- D puede ser degradado (figura 2). En la Figura 2 se parte del 2,4-D como anión libre, ya que es el que se encuentra más comúnmente en el medio ambiente. La degradación del 2, 4- D parece ser resultado de una fotodegradación o de una degradación microbiana. Se reportó que los principales metabolitos intermediarios de la degradación son el 2-clorohidroquinona (1,4-dihidroxi 2-clorofenol) y 2,4-diclorofenol y dióxido de carbono como metabolitos menores.

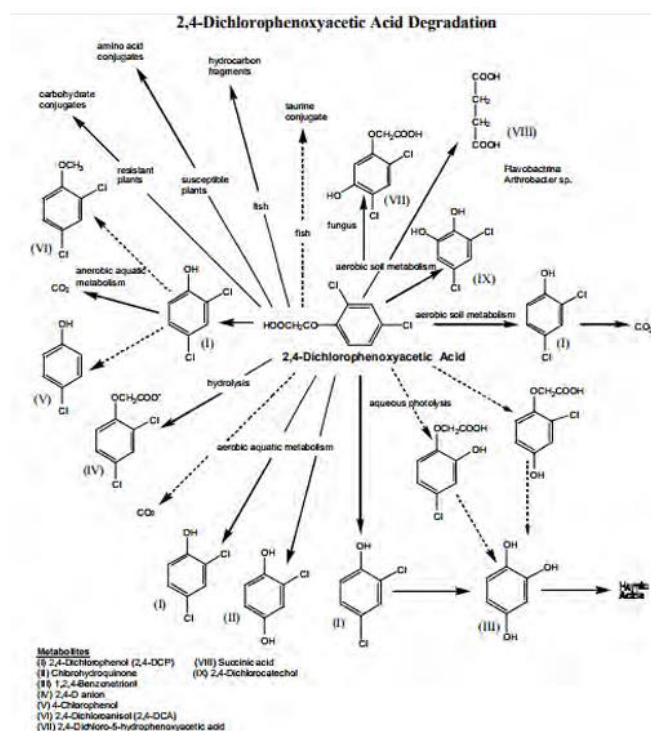


Figura 2. Principales vías de degradación del compuesto 2,4 diclorofenoxiacético mediante reacciones metabólicas. Tomada de Walter (1999).

Otro producto agronómico comercial es Humimax Plus®, que es un mejorador y acondicionador de suelos. El compuesto es formado a base de ácidos húmicos (AH) y ácidos fúlvicos (AF), que se derivan de leonardita, que ayuda aumentar la capacidad nutritiva de los suelos; haciéndolos más porosos y manejables. Además, promueve el crecimiento de las plantas (Baldotto & Baldotto, 2014). Los AH contribuyen a la movilidad de compuestos orgánicos iónicos como pesticidas y contaminantes, reducen los efectos de compactación y contrastes superficiales, de igual manera mejoran la retención de agua e incrementan la temperatura del suelo, en consecuencia, los AH optimizan los agentes hídricos, eólicos y térmicos, y aumentan la disponibilidad de algunos nutrientes (Noboa, 2019).

El humus (materia orgánica) se compone de una fracción soluble alcalina llamada sustancia húmica, que contienen una variedad de grupos funcionales incluyendo a los carboxilatos (COOH), hidroxilos fenólicos (ArOH), hidroxilos (OH) enólicos, hidroxilos (OH) alcohólicos, quinonas, hidroquinonas, lactosas, entre otros (Mendoza *et al.*, 2017). Las sustancias húmicas se originan a partir de la descomposición de la materia vegetal y animal que se encuentran en el suelo (Reyes *et al.*, 2021). La degradación de la materia orgánica es producto del metabolismo microbiano, que produce componentes con un alto grado de polimerización de color oscuro y no biodegradable,

además de que su estructura es irregular y de alto peso molecular (Aurora, 2010; Arriaga, 2023).

Las sustancias húmicas se clasifican dependiendo del tipo de proceso de separación que utilicen:

- Ácidos fúlvicos (AF): Son compuestos de bajo peso molecular (900 – 5000Da), se caracterizan por su bajo contenido de carbono y un significativo número de grupos funcionales (COOH), que les proporcionan una mayor acidez, con una notable capacidad de formar complejos en comparación a la registrada para los AH (Gonzalez, 2009). En condiciones de alcalinidad y ácidas son insolubles (Serrano *et al.*, 2015). Se forman por compuestos sólidos o semisólidos, no cristalinos.
- Ácidos húmicos (AH): Los que tienen alto peso molecular poseen una alta capacidad para intercambio de cationes (CIC), lo cuales son importantes en el proceso de estabilización de los agregados de bajo peso molecular (AF), son insolubles en medio ácido, de modo que, producen una mayor agregación. Poseen fuerzas electroquímicas que les permiten armar partículas de mayor dimensión (dominios); la unión de estas (microagregados), formará los agregados y en consecuencia se forman complejos de arcilla-cationes metálicos polivalentes-materia orgánica (López, 2006).

Sin embargo, los residuos propiciados por el uso excesivo de fertilizantes en la agricultura originan problemas de salinización de suelos y contaminación en mantos acuíferos. Cabe mencionar que el uso indiscriminado de un fertilizante para aportar un elemento asimilable puede originar un desequilibrio con otros elementos antagónicos y afectar el desarrollo de la planta (Díaz & Guzmán, 2004).

MARCO TEÓRICO

La presencia de los xenobióticos representa un riesgo para los ecosistemas y los seres humanos (El-Aziz, *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018). Existe una gran variedad de métodos químicos, físicos (lavado de suelo, coagulación, filtración, fotodegradación, etc.) y biológicos para la eliminación de contaminantes (Déley, 2012; Bera & Tank, 2021). Entre estos métodos está la biorremediación, que se basa en la

degradación, eliminación, alteración o desintoxicación de productos químicos a través de la acción metabólica de bacterias, hongos o plantas (Saavedra, 2020); en este sentido, los procesos son más sustentables y económicos (Cañizares, 2000). La biomasa microbiana representa ventajas importantes, por la actividad metabólica que desarrollan, representa una forma económica de cambiar el estado oxidado – reducción (redox) o para degradar los compuestos organometálicos. Se ha documentado que se pueden generar mejoras metabólicas de las cepas microbianas mediante la manipulación genética (Kulkarni & Kaliwal, 2014).

Los microorganismos interactúan tanto físicamente como químicamente con los contaminantes, por medio de alteraciones estructurales o en la desintegración completa del contaminante (Briceño & Correa, 2016). En cuanto a la descomposición del contaminante, se realiza por el metabolismo destinado al crecimiento celular. Durante la biorremediación, los microorganismos proliferan utilizando los contaminantes orgánicos, los nutrientes fundamentales (nitrógeno, potasio) y nutrientes menores (como azufre), junto con oligoelementos (Beltrán *et al.*, 2016; Arias, 2017). Los contaminantes sirven como fuente de electrones, ya que los microorganismos realizan reacciones redox, provocando la desintegración completa de los compuestos orgánicos (Trump *et al.*, 2018).

Las oxidaciones, catalizadas por oxigenasas y peroxidasas, que utilizan oxígeno para incorporar el sustrato, son reacciones enzimáticas primarias que tienen lugar durante la biodegradación aeróbica (Pucci & Pucci, 2015). Aquellos organismos biodegradadores requieren oxígeno en dos etapas metabólicas a) durante el ataque inicial sobre el sustrato y b) al completar la cadena respiratoria (Ercoli *et al.*, 2001). En el proceso aeróbico, el O₂ aumenta la tasa de proliferación y el metabolismo de los microorganismos aeróbicos (Álvaro, 2017). Estos producirán monooxigenasas y dioxigenasas, que son útiles en la oxidación de hidrocarburos.

Existen poblaciones microbianas nativas en medios contaminados, que presentan adaptaciones a las condiciones climáticas, fisicoquímicas y nutricionales, pero con frecuencia no incluyen especies con la actividad enzimática necesarias para iniciar la biorremediación y / o prosiga a mayor velocidad, resultando en procesos de larga duración (Olguín *et al.*, 2017).

Características generales del modelo de biorremediación microbiana (*Pseudomonas putida* KT2440)

Información taxonómica

Dentro de la gran variedad de especies microbianas con potencial bioremediador se encuentra la especie *Pseudomonas putida*, específicamente la cepa KT2440 (Palleroni, 1984), que es un aislado derivado de la cepa *P. putida* mt-2, que tuvo lugar en Japón a principios de la década de 1960 (Jiménez *et al.*, 2002). *P. putida* KT2440 pertenece a la familia de Pseudomonadaceae, al género *Pseudomonas*, la división gammaproteobacteria y al phylum Proteobacteria (Bermúdez, 2013, Izrael, *et al.*, 2019; Lalucat *et al.*, 2020).

Genoma

El genoma de *P. putida* KT2440 consta de un único cromosoma circular de 6.181.863 pares de bases (pb), que contienen un porcentaje G+C que varían entre el 43% y el 69% (teniendo ventanas de 4 kpb) consta de un valor medio del 61.6 % (Belda *et al.*, 2016). Dentro del genoma de KT2440 existen islas de genes que son adquiridos por transferencia horizontal de genes, codificando así enzimas para la movilización, absorción y metabolismo de aminoácidos y opina, resistencia al arseniato, resistencia a metales pesados (cobre, cadmio), respuesta al estrés oxidativo (peroxidasa), biosíntesis de metabolitos, proteínas reguladoras y un sistema de modificación de restricción tipo I (Roca, 2009; Romero, 2023).

Hábitat

La cepa *P. putida* KT2440 no es patógena y se encuentra de manera natural en el suelo, además de ser saprofita (Nitschel *et al.*, 2020). Si bien es cierto que esta cepa no es patógena, puede sobrevivir a entornos hospitalarios, ya que tiene múltiple resistencia a antibióticos, como al cloranfenicol, dado que carece de enzimas modificadoras a este antibiótico, su tolerancia se debe a una combinación de defensas microbianas que incluyen reguladores transcripcionales, que permiten la inducción de bombas de extrusión de múltiples fármacos, junto con una sobreproducción de proteínas ribosómicas que siguen la activación de un programa de respuesta al estrés (Fernández *et al.*, 2012).

Características morfológicas

La especie *P. putida* KT2440 se define como bacilos ligeramente curvados, con 0.5 – 1.0 μm de longitud, son Gram-negativos, tiene presencia de uno o varios flagelos polares y no forman esporas (Pérez *et al.*, 2015; Sing *et al.*, 2019). Estos microorganismos son aeróbicos cuando utilizan al oxígeno como aceptor de electrones (Arai, 2011); sin embargo, el nitrato tiene la posibilidad de ser un aceptor de electrones alternativo en algunos casos, lo cual permite que el crecimiento se produzca de forma anaeróbica (Bermúdez, 2013). Junto a esto, su principal sistema de energía es la respiración, que usa la fuerza motriz de protones para la síntesis de ATP (Belda, 2016). Los protones penetran en la membrana mediante complejos enzimáticos, produciendo un gradiente de protones (Mulet, 2012; Belda *et al.*, 2016; Demling *et al.*, 2021).

Metabolismo

P. putida KT2440 puede metabolizar la glucosa, fructosa y benzoato mediante la vía de Entner-Doudoroff (ED), la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y la vía del β -cetoadipato (Torres, 2013; Meliani & Bensoltane, 2014). *P. putida* KT2440 posee un transporte de glucosa al citoplasma, el sistema fosfoenolpiruvato, que es controlado por un sistema de absorción ABC, fosforilando a glucosa-6-fosfato (G6P). La glucosa también se difunde hacia el periplasma y se convierte en gluconato y 2-cetoclucanato; estos metabolitos se transportan al citoplasma y posteriormente se fosforilan y se reducen a 6-fosfoluconato, luego mediante el sistema de permeasas PTS, se convierten en fructosa-1-fosfato (F1P), seguido de esto, se transforma en fructosa-1,6-bisfosfato (FBP) (Bharwad & Rajkumar, 2019). Después, la FBP puede seguir una ruta EMP inversa/anabólica y luego ingresar a la vía ED o puede ser procesada por la ruta EMP glucolítica estándar (Ortega & Rivas, 2003). En cuanto a la absorción del benzoato en el citoplasma, es mediada por una permeasa y después es procesada mediante las vías β -cetoadipato, dando como resultado los intermediarios centrales acetil coenzima A (Ac-CoA) y succinato (SUCC) (Duque *et al.*, 2022). En cuanto a los intermediarios metabólicos implicados en las vías correspondientes, estos se abrevian de la siguiente forma: F6P, fructosa-6-fosfato; R5P, ribulosa-5-fosfato; GAP, gliceraldehído-3-fosfato; DHAP, fosfato de dihidroxiacetona; PYR, piruvato (Wang *et al.*, 1959) (**Figura 3**). Además, *P. putida* KT2440 codifica una amplia gama de

enzimas que pueden eliminar los radicales libres de oxígeno, como la superóxido dismutasa, peroxidasas y otras enzimas capaces de combatir agentes oxidantes (Alonso *et al.*, 2022).

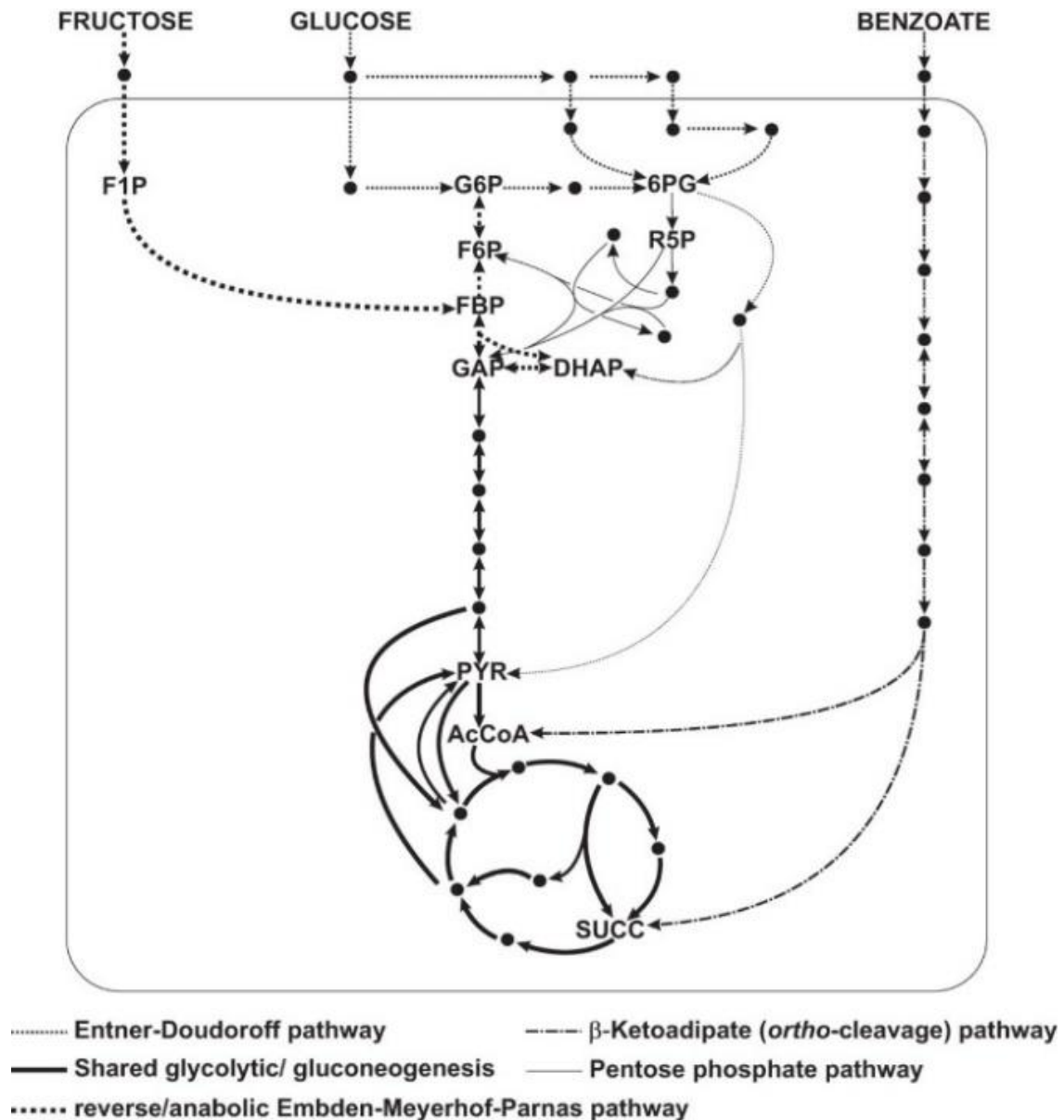


Figura 3. Metabolismo de *P. putida* KT2440 de glucosa, fructosa y benzoato mediante la vía de Entner-Doudoroff (ED), la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y la vía del β -cetoadipato. Tomada de Meliani & Bensoltane (2014).

Un ejemplo de la capacidad metabólica de *P. putida* es que codifica una enzima deshidrogenasa que convierte alcanos en aldehídos por medio de la hidroperoxidasa del n- Ahp sin que exista un intercambio de alcohol; esta ruta metabólica es la vía de Finnerty, promoviendo así el crecimiento vegetal (Benavides *et al.*, 2006). Junto a

esto, *Pseudomonas putida* KT2440 tiene el potencial de promover el crecimiento en situaciones adversas, ya que tolera condiciones salinas y altas temperaturas. Por esta razón, puede ser aplicada en áreas del suelo afectadas por estrés térmico, hídrico, salinidad o presencia de metales pesados (Vázquez & Muñoz, 2023). También se ha documentado que las plantas de soja y maíz que son inoculadas con *Pseudomonas putida* KT2440 presentan mejoras notables en la germinación de las semillas, así como en la longitud de las raíces y los tallos de estas plantas, en especial en condiciones salinas, en comparación con aquellas no inoculadas (Costa *et al.*, 2020).

La cepa *P. putida* KT2440 deriva de *P. putida* mt-2, que fue aislada como degradador del ácido 3-metilbenzoico de una muestra de suelo en Japón en 1960. Esta propiedad metabólica se relacionó con la presencia del plásmido TOL catabólico autotransmisible pWW0, que codifica un conjunto de enzimas que permiten que *P. putida* crezca en varios hidrocarburos aromáticos como tolueno, m-xileno y p-xileno. Después de someter la cepa a mutagénesis, se han seleccionado clones capaces de degradar sustancias químicas recalcitrantes como el p-etilbenzoato (Duque *et al.*, 2022).

ANTECEDENTES

P. putida es un modelo prometedor para la biotecnología, dado su metabolismo versátil, que le permite el uso de diferentes fuentes de carbono. Esto indica que, esta bacteria podría contribuir a la degradación de contaminantes, tolerando así los ambientes con estrés oxidativo y con altas concentraciones de solventes orgánicos (Jiménez, 2022).

Pseudomonas putida KT2440 metaboliza contaminantes químicos presentes en el ambiente como: el petróleo, aromáticos, alcanos, mediante la oxidación de estos compuestos; además, elimina los metales pesados y varios compuestos tóxicos (benceno, quinaldina, heterocíclicos) (Kahlon, 2016).

En otro estudio, se determinó la capacidad que tiene *P. putida* KT2440 para prevalecer en ambientes con altos índices de estrés por contaminación. Esta bacteria tiene la capacidad de adaptarse a estos ambientes debido a que desarrolla y combina las vías de Entner-Doudoroff, gluconeogénica Embden-Meyerhoff-Pernass y pentosa

fosfato que juntas forman el ciclo EDMP. El resultado de este metabolismo es un exceso de poder reductor de NADPH, estas rutas metabólicas le confieren a este organismo la capacidad de metabolizar una amplia gama de moléculas complejas y algunas consideradas como tóxicas (Romero, 2023). Junto con la capacidad de degradar n-alcenos y metilnaftalenos mediante la oxidación con una hidroxilasa (Gómez, 2021).

Palleroni y colaboradores (2010), demostraron que *P. putida* KT2440 crece en un medio mínimo a expensas de benzoato, 4-hidroxibenzoato, bencilamina, fenilacetato, fenilalanina, tirosina, feniletilamina, fenilhexanoato, fenilheptanoato, peniloctanoato, alcohol coniferílico, 4-cumarato, 4-hidroxifenilpropionato, ferulado, cafeato, vainilla, nicotinato y quinato, debido a que estos compuestos los utiliza la bacteria como fuentes de carbono, y le proporcionan energía a la célula.

Wang y sus colaboradores (2023) determinaron que la expresión del plásmido NAH7 que se transfirió a *P. putida* KT2440, le permitió a la bacteria degradar el naftaleno, aliviando así el estrés celular provocado por el compuesto tóxico.

Asimismo, *P. putida* KT2440, produce enzimas como las deshidrogenasas, oxigenasas, citocromos, glutatión-S transferasas y bombas de eflujo, que le permiten a la bacteria descomponer el petróleo crudo y efluentes industriales (Das *et al.*, 2023).

Ivanova y colaboradores (2022) evidenciaron que KT2440 es una cepa sensible al tolueno, y presenta viabilidad en presencia de bajas concentraciones de este aromático. Adicionalmente, esta bacteria presentó represión de la biosíntesis de flagelos debido a la toxicidad del tolueno, por este motivo su metabolismo lo dirigió a la supervivencia en condiciones extremas para degradar el tolueno. Se afirma que esta bacteria es capaz de protegerse contra compuestos tóxicos, mediante la eliminación de estos, a través de bombas de extrusión como las bombas RND (Resistencia, Nodulación y División) y los transportadores MFS (por sus siglas en inglés Major Facilitator Superfamily) (Jiménez, 2022).

En un estudio con un enfoque de ingeniería metabólica demostró que *P. putida* KT2440 degradó aeróbicamente el tricloropropano (TCP), logrando reconstruir la vía sintética mediante inserción de tres enzimas (epóxido hidrolasa, haloalcano deshalogenasa y haloalcohol deshalogenasa) extraídas de *Rhodopseudomonas*

palustris. Esta nueva ruta metabólica convierte el TCP en glicerol. Por lo anterior, la cepa resultante fue capaz de hacer uso de TCP como única fuente de carbono para el crecimiento (Sharma & Shukla, 2022).

Se ha demostrado, que *P. putida* KT2442, disminuyó la concentración de naftaleno de 2.0 a 0.2 mg/g mientras que las bacterias degradadoras autóctonas solo degradaron hasta 0.6 mg naftaleno/ g de suelo, en un suelo experimental contaminado con este compuesto orgánico volátil. Por otro lado, la inoculación de la cepa genéticamente modificada VM1441 (pNAH7) en plantas de guisantes, la bacteria es capaz de degradar este compuesto (hasta un 40%) en un ambiente con alta concentración de naftaleno, en comparación con plantas que fueron inoculadas en suelo contaminado artificialmente (Fernández *et al.*, 2017).

Yah (2018) aisló cinco cepas que presentaban un historial de exposición al herbicida 2,4 diclorofenoxiacético en la zona cañera de Belice. Las cepas B01 y B03 para evaluar las degradaron el 32.31% y 29.87% del herbicida, respectivamente, de la concentración inicial en un período de 144 horas. También, se ha documentado que el género *Pseudomonas* es capaz de utilizar 2,4-D como fuente de carbono y energía (Akintui *et al.*, 2018).

Pseudomona aeruginosa, *P. putida* y *Pseudomona fluorescens* presentan una alta capacidad de degradación de organofosforados provenientes de plaguicidas, teniendo en su fórmula química esteres de ácido fosfórico con una variedad de alcoholes, caracterizados por ser tóxicos y persistentes en el ambiente, son utilizados como herbicidas para el control de malezas en diferentes cultivos (Caballero, 2019).

Se ha registrado que *Pseudomonas* es capaz de degradar componentes tóxicos utilizados en la agricultura como lo son el endosulfán, imidacloprid y DDT (Palomino, 2022).

Realizó una investigación evaluando la degradación del glifosato presente en los herbicidas, utilizando algunas especies del género *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens*), donde los resultados arrojaron que lo tolera hasta un 2% (Martínez *et al.*, 2012)

Pseudomonas aeruginosa, *Stenotrophomonas pavanii*, *Acinetobacter lactucae*, *Fusarium sp.* y *Talaromyces variabilis* son cepas que toleran 2,4-D y malatión (Rosado *et al.*, 2020).

Por otro lado, el metabolismo versátil de *P. putida* KT2440, le permite promover el crecimiento de plantas mediante la solubilización de fosfatos y producción de sideróforos (Molina *et al.*, 2017).

JUSTIFICACIÓN

La utilización de productos que generan desechos de tipo xenobiótico están vinculados con la contaminación de la litósfera y la biósfera. Para contrarrestar los efectos de dicha contaminación se han implementado metodologías fisicoquímicas como utilizar bacterias con alto potencial biorremediador, ya que representa una alternativa amigable con el ambiente que pudiera reducir el empleo elevado de químicos, así como de los desechos generados durante el proceso, como es el caso de los residuos generados por técnicas de separación. Se ha demostrado que estos últimos, aumentan los costos y la necesidad de los permisos. Otro ejemplo son los fluidos de extracción, que pueden aumentar la movilidad de los contaminantes.

HIPÓTESIS

La bacteria *Pseudomonas putida* KT2440 será capaz de tolerar y/o degradar el diésel, la gasolina y los herbicidas, al utilizarlos como fuente de carbono; por lo que la bacteria reducirá o incluso eliminará estos xenobióticos del medio ambiente.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La bacteria *Pseudomonas putida* KT2440 tendrá la capacidad de tolerar y/o crecer en un medio de cultivo donde esté presente algún hidrocarburo o un herbicida?

¿Qué concentración de diésel, gasolina o herbicida será capaz de tolerar *P. putida* KT2440?

¿La bacteria *P. putida* KT2440 será capaz de disminuir la concentración del diésel, gasolina o herbicida en su entorno a través del tiempo?

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de tolerancia y/o degradación que posee *Pseudomonas putida* KT2440 ante la presencia de diésel, gasolina o herbicidas.

Objetivos específicos

- Determinar el crecimiento de la población bacteriana en medios de cultivo con presencia de diésel, gasolina o herbicidas.
- Evaluar la concentración de diésel, gasolina o herbicida que es capaz de tolerar *P. putida* KT2440.
- Cuantificar la disminución de la concentración de los compuestos xenobióticos, mediado por la actividad metabólica de la bacteria

MATERIAL Y MÉTODOS

Microrganismo

La cepa bacteriana fue proporcionada por el Dr. Antonino Báez Rogelio, perteneciente al laboratorio de Producción de Biológicos en el Edificio Multiaulas 6, perteneciente al Centro de Ciencias Microbiológicas ICUAP-BUAP.

La cepa fue reactivada en citrato de Simmons- [Cm] ¹⁰⁰ (CS con CHL (cloranfenicol):50 µg/mL de medio).

Medios de cultivo

Para los ensayos de degradación, el preinóculo de *P. putida* KT2440 se cultivó en medio líquido Luria Bertani (LB), que contenía 10 g/L de peptona de caseína, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl. Cuando se requirió, la bacteria se cultivó (ajustando el D.O. = 0.05) en medio mínimo M9 con diésel, gasolina o herbicida como única fuente de carbono. Para preparar 50 mL de medio M9, se midieron los siguientes volúmenes de soluciones “stock” (ver anexo 1) y se aforó a un volumen final de 50 mL: 50 µL de FeCl₃, 125 µL de Goodies, 5 mL de sales 10X M9, 50 µL de MgSO₄ y 500 o 2000 µL de la fuente de carbono según la concentración a evaluar (Ver anexo 1).

Tratamientos utilizados

Para esta tesis se tuvieron los siguientes tratamientos a una concentración del 1% v/v, ya que se documentó que las bacterias pueden llegar a tolerar un medio con xenobióticos de tipo agroquímico de hasta 12 g/L (2% v/v) (Fan *et al.*, 2012). Se establecieron los siguientes tratamientos: control negativo (medio M9 sin fuente de carbono), control positivo (medio M9 con citrato como fuente de carbono), diésel (medio M9 con 1% diésel), gasolina (medio M9 con 1% gasolina), Humimax Plus® (Medio M9 con 1% Humimax) y Desmonte 4EB® (medio M9 con 1% Desmonte).

La capacidad de resistencia de *P. putida* KT2440 a xenobióticos se evaluó en 1% y 4% (v/v).

Fuentes de carbono

En este experimento se utilizaron diésel y gasolina Magna, ambos de la marca Pemex® que fue colectada en C. Universal 6301, Cd Universitaria, 72570 Heroica Puebla de Zaragoza, Pue. Los derivados del petróleo se colectaron en un vaso estéril. Por otra parte, los productos agroquímicos Humimax Plus® y Desmonte 4EB® los proporcionó el Sr. Victor Sosa Hernández, de la comunidad El Carmen Xalpatlahuaya, 90500, Huamantla, Tlaxcala. Para cada “stock” utilizado como fuente de carbono se realizó una prueba de esterilidad sembrando de forma masiva una muestra en LB para confirmar que no existieran microorganismos en estas sustancias. Los productos químicos se dejaron a temperatura ambiente, en un cuarto sin exposición a la luz para evitar la descomposición de los compuestos.

Condiciones generales de cultivo

El crecimiento de los cultivos líquidos de *P. putida* KT2440 en LB o medio mínimo M9 se realizó en tubos Falcon de 15 mL con 5 mL de medio LB (para el preinóculo) y en matraces de 125 mL con 50 mL de medio M9 (para el ensayo de degradación). Los cultivos en matraz se incubaron a 30 °C y con agitación de 140 rpm. Se ajustó el pH utilizando ácido cítrico e hidróxido de sodio a 1M para tener un pH= 7. Los cultivos en medio sólidos se incubaron a 30 °C por 24 horas.

Técnicas microbiológicas

Curvas de crecimiento en presencia de diferentes fuentes de carbono

En las curvas de crecimiento bacteriano se cuantificó la población bacteriana mediante diluciones seriadas de la muestra para determinar las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de cultivo (UFC/mL). Para la realización de estas curvas de crecimiento en matraz, se partió de un precultivo en medio líquido LB incubado a 30 °C por 24 horas. Se inoculó el matraz con el precultivo ajustando la D.O (0.02) a 540 nm, se aplicó la siguiente formula:

$$C1V1=C2V2$$

V1=Volumen del preinóculo a colocar

V2= Volumen del matraz a inocular

C1= D.O observada en el espectrofotómetro

C2= D.O ajustada (0.02)

Se evaluó la población a las 0, 24, 48 y 72 horas por el método de Drop plate, se tomaron alícuotas en cada periodo, se realizaron diluciones seriadas de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-6} , se sembraron 20 µL de cada disolución en placas con medio Citrato de Simmons (con cloranfenicol 50 µg /mL). Las condiciones de incubación fueron 24 horas a 30 °C, se tomó en cuenta las diluciones que contuvieron las UFC más aisladas y se calculó las UFC/mL. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Barrido espectrofotométrico de las muestras de M9 con hidrocarburo y herbicida

Para determinar la longitud de onda adecuada para cuantificar la gasolina, el diésel o el herbicida mediante espectrofotometría, se realizó un barrido de 190 hasta 600 nm. El barrido se realizó con el medio sin inocular y con la fuente de carbono de cada tratamiento al 1% de concentración; para la muestra con diésel y gasolina se buscó un pico de absorción cercano a los 254 nm, lo cual reporta la literatura como mayor pico de absorción **(Figura 4 y 5)**.

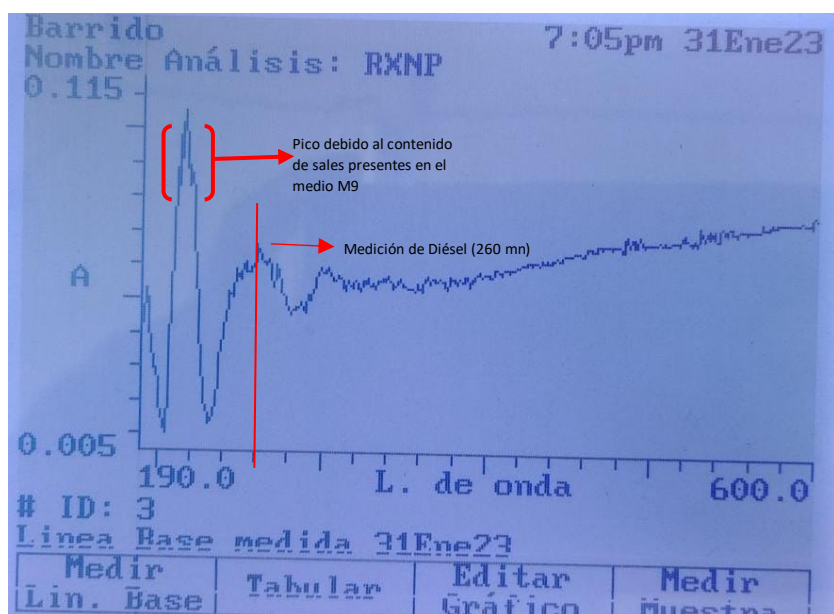


Figura 4. Barrido espectrofotométrico UV-Vis del M9 con la fuente de carbono diésel al 1%

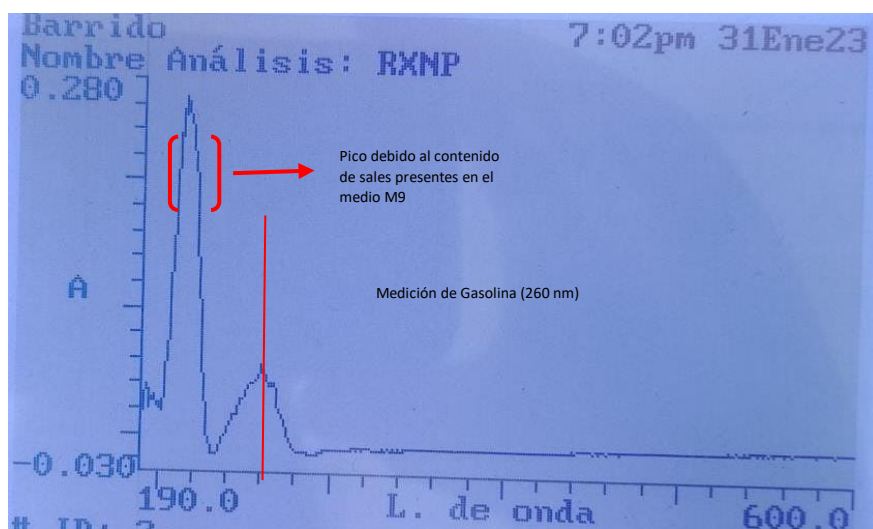


Figura 5. Barrido espectrofotométrico UV-Vis del M9 con la fuente de carbono gasolina al 1%.

Para el caso de la muestra de M9 con Humimax Plus® o Desmonte® al 1% no se observó ningún pico único de absorción de luz UV (Figura 6 y 7).

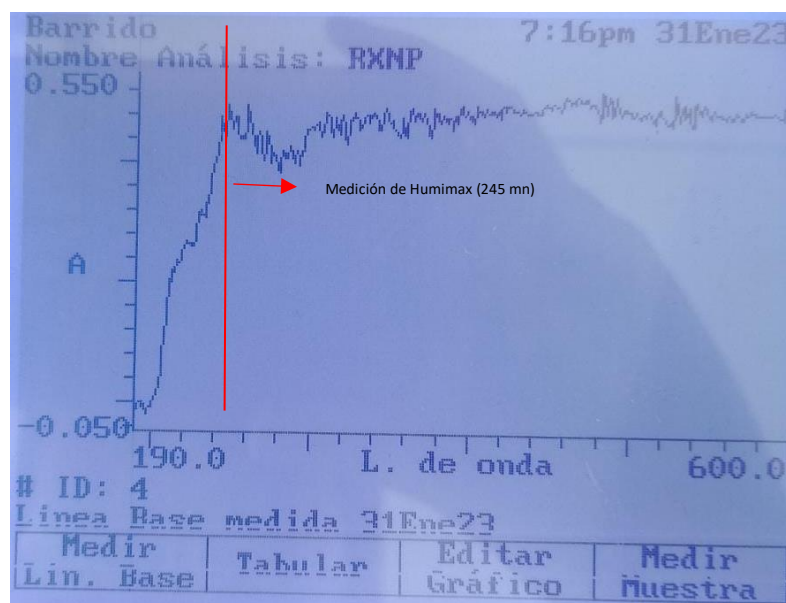


Figura 6. Barrido espectrofotométrico UV-Vis del M9 con la fuente de carbono Humimax Plus® al 1%

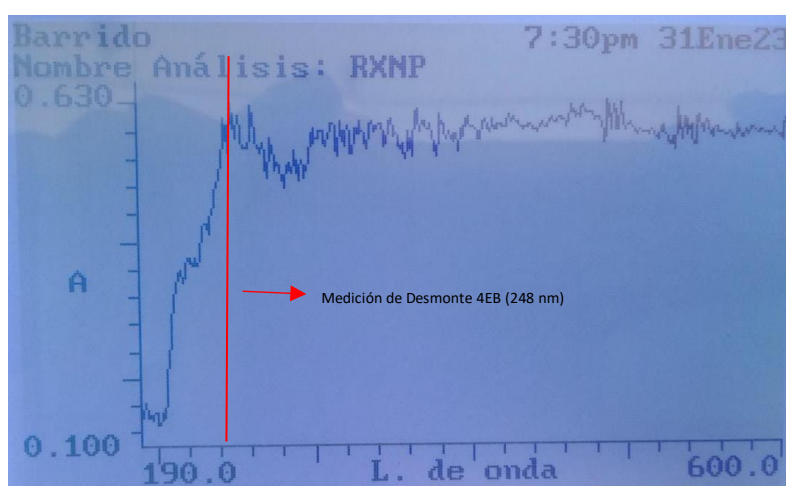


Figura 7. Barrido espectrofotométrico UV-Vis del M9 con la fuente de carbono Desmonte 4EB® al 1%.

Curvas de calibración

Se elaboró una curva de calibración para determinar la concentración del hidrocarburo diésel o gasolina en el medio. Se prepararon soluciones al 1%, 0.5% y 0.2% (V/V) de los dos hidrocarburos y se graficaron los valores de absorbancia para cada dilución en la longitud de onda de 260 nm (**Figura 8 y Figura 9**).

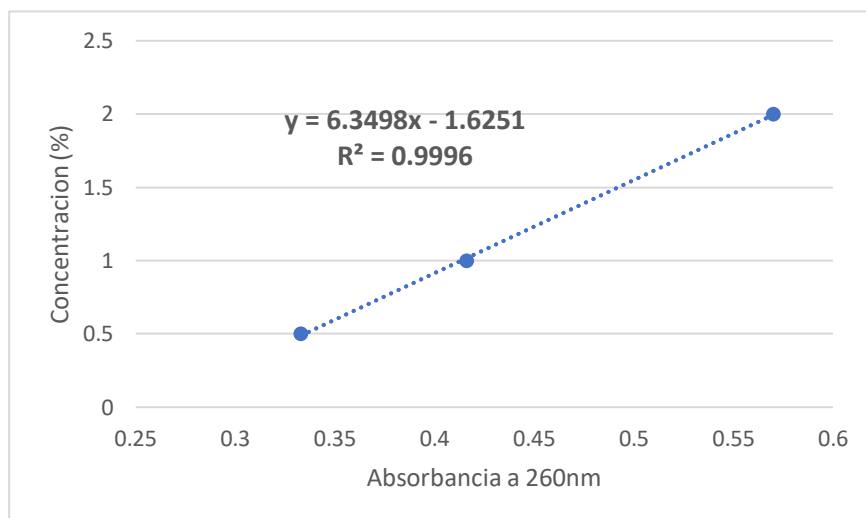


Figura 8. Curva de calibración del diésel

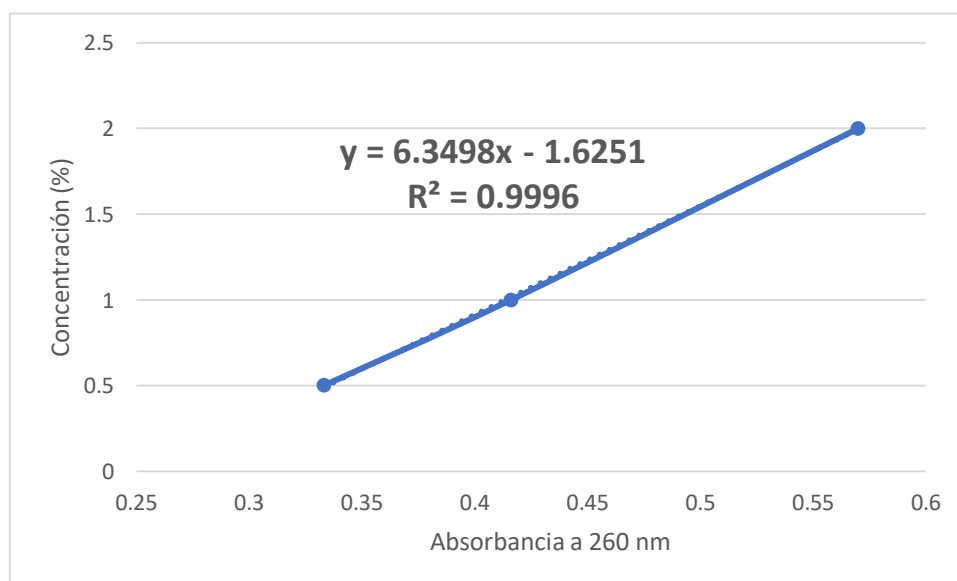


Figura 9. Curva de calibración de la gasolina.

Posteriormente estas curvas se usaron para cuantificar el diésel o gasolina en las muestras colectadas a las 0, 24 y 48 horas de cultivo. La muestra se centrifugo a 3000 rpm durante 10 minutos, posteriormente el sobrenadante se agito por 1 minuto y se evaluó la absorbancia en el espectrofotómetro. En el caso particular de los agroquímicos no se pudo determinar la concentración por espectrofotometría debido a la interferencia en la absorbancia de otros compuestos presentes en la muestra.

Análisis por Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de Masa (CG-EM) del cultivo al 4% de gasolina y diésel

En este estudio, se realizó una extracción con solventes de las muestras a las 0, 24, 48 y 72 hrs para su análisis mediante CG-EM. Se tomó una alícuota de 1 mL de cada cultivo, se homogenizó con el vortex por 1 minuto, se centrifugó a 13000 rpm por 2 minutos, se colectaron 500 µL del sobrenadante y se mezclaron con 500 µL de diclorometano en un tubo de 1mL. Esta mezcla se homogenizó con el vortex por 1 minuto y se centrifugó a 13000 rpm por 2 minutos. A partir de la fase orgánica se tomaron 100 µL y se mezclaron con 900 µL de diclorometano en un tubo de vidrio, para su posterior análisis mediante CG-EM.

Condiciones de CG-EM

Para la realización del análisis de CG-EM se colocaron las muestras en un cromatógrafo de gases serie GC Agilet Technologies serie 5975C, se inyectó 1 µL de cada muestra, utilizando diclorometano como solvente. Se utilizó una columna capilar: ZB- 50 (50% diclorometano -50% dimetilpolisiloxano), 30 mm de longitud, 0.5 mm de diámetro interno y 25 µm de espesor de película. El inyector estuvo a 180 °C; detector a 270°C; el horno tuvo una rampa de temperatura de 56 °C/ 4 minutos; 66°C/ 1 minuto; 76°C/ 1 minuto; 86°C/ 1 minutos, 96°C/ 1 minutos, 108 °C/ 12 minutos, hasta llegar a 290 °C.

Asimismo, la abundancia de cada compuesto se comparó en relación con el sistema de análisis comparativo (CAS) para poder determinar el posible compuesto degradado **(Ver anexo 2)**.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las curvas de crecimiento bacteriano se realizaron por triplicado y se analizaron mediante un análisis de varianza multifactorial (MANOVA), para los datos que presentaron diferencia significativa se llevó a cabo una comparación múltiple de medias por el método de diferencia significativa real (HSD) Tukey ($\alpha=0.5$), junto con una prueba de normalidad Anderson-Darling utilizando el programa estadístico Minitab (versión 18.1 para Windows).

En el análisis MANOVA se agruparon los datos por tratamiento y se realizó un promedio de las $\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$ respecto a las diferentes horas (0, 24, 48 y 72), posteriormente, se comparó el promedio de las $\text{Log}_{10}\text{ UFC/mL}$ respecto a la hora de muestreo, además, se comparó la interacción entre las agrupaciones anteriormente mencionadas.

La prueba de normalidad consistió en la comparación de la función de distribución acumulada empírica (ECDF) de los datos de la muestra ($\text{Log}_{10}\text{ UFC/mL}$) con la distribución esperada si los datos fueran normales. Si la diferencia observada tiene un valor de $p < 0.05$, se consideran que los datos de las $\text{Log}_{10}\text{ UFC/mL}$ tienen una distribución normal.

La prueba de Tukey consistió en agrupar a las $\text{Log}_{10}\text{ UFC/mL}$ de cada fuente de carbono, al obtener los promedios los datos de cada grupo, posteriormente se compararon los grupos por parejas.

RESULTADOS

Crecimiento de *P. putida* KT2440 en M9 con hidrocarburos y agroquímicos al 1%

En el ensayo con citrato de sodio (control positivo con 2 g/L) se obtuvo el mayor crecimiento de la población bacteriana; el cultivo inició con una población de 4.8 $\text{Log}_{10}\text{ UFC/mL}$ a las 0 hrs y finalizó con 7.5 $\text{Log}_{10}\text{ UFC/mL}$ a las 72 h de cultivo; seguida del hidrocarburo diésel que en 72 h aumentó dos órdenes de magnitud (de 5 a 7.09 $\text{Log}_{10}\text{ UFC/mL}$), en tercer lugar la gasolina que inició con una población de 4.7 y en 72 h aumentó a 6.13 $\text{Log}_{10}\text{ UFC/mL}$, el fertilizante Humimax Plus® tuvo un crecimiento de un orden de magnitud a las 72 horas (de 4.4 a 5.8 $\text{Log}_{10}\text{ UFC/mL}$), en el control negativo (sin fuente de carbono) la población se mantuvo constante durante todo el

experimento ($5 - 5.5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$), para el tratamiento con el herbicida Desmonte-4EB® la población bacteriana disminuyó un orden de magnitud a las 24 horas (de 4.5 a $3.5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$) y prácticamente ya no se recuperó durante el resto del cultivo (**Figura 10**). El conteo de la población bacteriana a las 96 horas mostró que los cultivos llegaron a fase estacionaria.

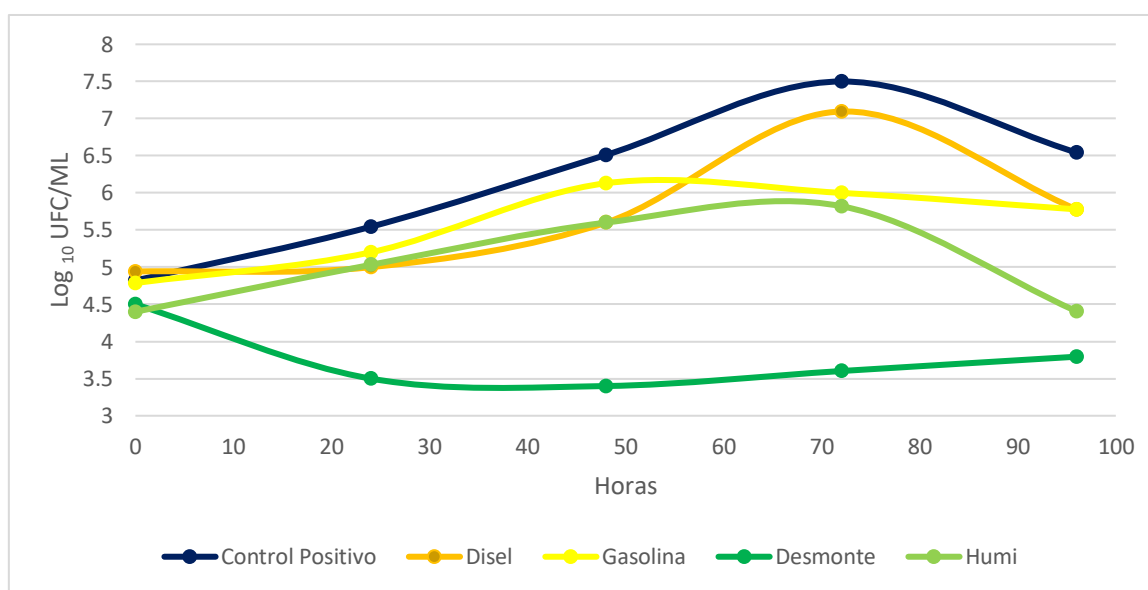


Figura 10. Gráfica de crecimiento bacteriano con hidrocarburos y agroquímicos como fuente de carbono al 1%. El crecimiento bacteriano se evaluó mediante el método de Drop plate. La fuente de carbono citrato de sodio es el cControl pPositivo, el Diésel y la Gasolina son fuentes de carbono de tipo hidrocarburos, Humimax Plus® y Desmonte-4EB® son los agroquímicos.

Prueba de normalidad de los valores de $\text{Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ para cada uno de los tratamientos cuando los hidrocarburos y agroquímicos están al 1%

La prueba de Anderson-Darling mostró que los datos son normales, al comparar función de distribución acumulada empírica (ECDF) de los datos de la muestra ($\text{Log}_{10} \text{ UFC/mL}$). Como se puede observar en la Figura 11, los datos se posicionaron en la línea central, se obtuvo un valor $p = 0.645$. Dado que el valor p es mayor que el nivel de significancia (0.05), los datos cumplen el supuesto de normalidad para una prueba t (**Figura 11**).

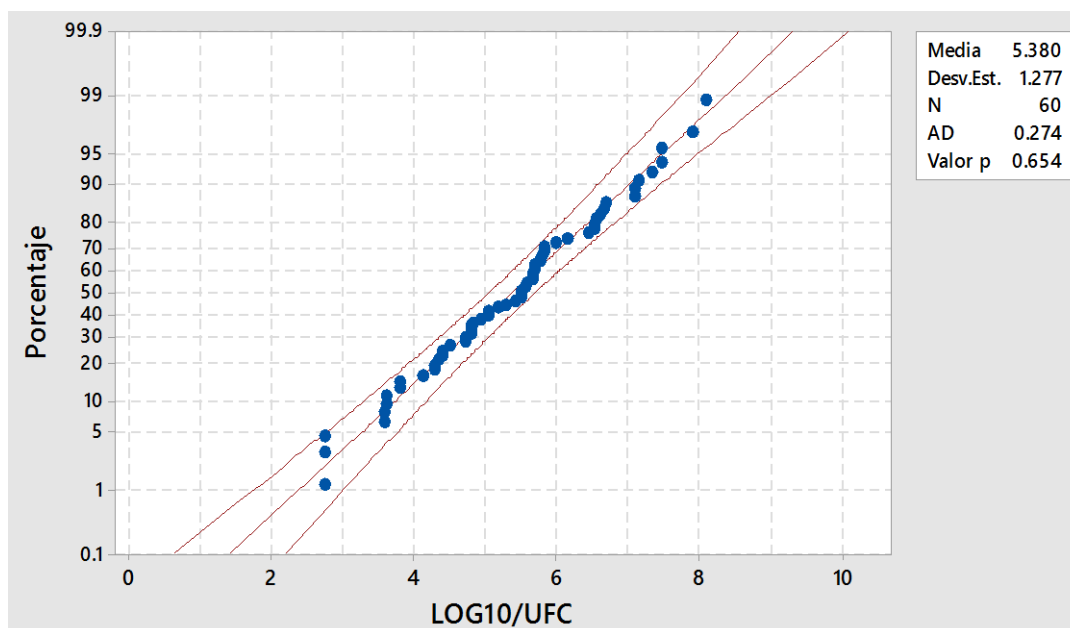


Figura 11. Resultados de prueba de normalidad de Log_{10} UFC/mL al 1%, con 95% de confianza, los datos se ajustan a la distribución normal. N= número de datos analizados, AD: Anderson-Darling, Desv.Est: Desviación estándar.

Prueba de MANOVA de los valores de Log_{10} UFC/mL agrupados por fuente de carbono o por el tiempo de la medición cuando los hidrocarburos y agroquímicos están al 1%

A los datos normales se les aplicó un análisis de MANOVA, donde se compararon los grupos entre sí. Los valores de Log_{10} UFC/mL se agruparon dependiendo de la fuente de carbono o dependiendo del tiempo de medición. Es decir que los valores de Log_{10} UFC/mL al tiempo 0 del cultivo control negativo, control positivo, diésel, gasolina, Desmonte® y Humimax Plus® formaron un grupo, los registrados a las 24 h, formaron otro grupo y así sucesivamente. Los resultados obtenidos nos indican que los datos agrupados por hora de crecimiento no presentaron diferencia significativa ($p=0.703 < \alpha$); por otra parte, los datos agrupados por fuentes de carbono si mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.004 > \alpha= 0.05$) (**Tabla 1**).

Grupo	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Fuente de carbono	5	26.483	5.2967	4.37	0.004
Hora de crecimiento	4	2.649	0.6623	0.55	0.703
Fuente de carbono*Hora de crecimiento	20	30.768	1.5384	1.27	0.271
Error	30	36.355	1.2118		
Total	59	96.256			

Tabla 1. Resultados del análisis de MANOVA del experimento al 1% (v/v). Grados de libertad (GL), Suma de Cuadrados Ajustada (SC Ajust.).

Comparación de medias de Log₁₀ UFC/mL por grupos mediante la Prueba de Tukey

Los resultados de la prueba de Tukey arrojaron que las medias que no tienen diferencia estadística son las que comparten dos letras iguales, y observamos que el control positivo, Desmonte® y Humimax Plus® tienen solo una letra, lo que significa que si hay diferencia significativa entre esos grupos. En el caso de Gasolina, Diésel y el control negativo, no tienen medias significativamente diferentes y comparten dos letras. Esto se ve desglosado en la **Tabla 3**, donde la comparación de Desmonte® respecto al control positivo tiene un valor de $p = 0.017$, Humimax Plus® respecto al control positivo tiene una $p = 0.013$, reafirmando que ambos herbicidas presentan medias con diferencias significativas (**Tabla 2, Figura 12**).

Tratamiento	N	Media	Agrupación	
Control Positivo	10	6.23618	A	
Gasolina	10	5.80069	A	B
Diésel	10	5.72233	A	B
Control Negativo	10	5.54316	A	B
Desmonte®	10	4.51564		B
Humimax Plus®	10	4.45946		B

Tabla 2. Resultados del análisis de las medias por grupos mediante la prueba de Tukey: cultivos con 1% de fuente de carbono

Diferencia de Tratamiento niveles	Diferencia de medias	EE de diferencia	IC de 95%	simultáneo Valor T	Valor p ajustado
control positivo vs control negativo	0.693	0.492	(-0.804, 2.190)	1.41	0.722
Desmorte® vs control negativo	-1.028	0.492	(-2.524, 0.469)	-2.09	0.321
Diésel vs control negativo	0.179	0.492	(-1.318, 1.676)	0.36	0.999
Gasolina vs control negativo	0.258	0.492	(-1.239, 1.754)	0.52	0.995
Humimax Plus® vs control negativo	-1.084	0.492	(-2.581, 0.413)	-2.20	0.267
Desmorte® vs control positivo	-1.721	0.492	(-3.217, -0.224)	-3.49	0.017
Diésel vs control positivo	-0.514	0.492	(-2.011, 0.983)	-1.04	0.899
Gasolina vs control positivo	-0.435	0.492	(-1.932, 1.061)	-0.88	0.947
Humimax Plus® vs control positivo	-1.777	0.492	(-3.274, -0.280)	-3.61	0.013
Diésel vs Desmorte®	1.207	0.492	(-0.290, 2.704)	2.45	0.171
Gasolina vs Desmorte®	1.285	0.492	(-0.212, 2.782)	2.61	0.126
Humimax Plus® vs Desmorte®	-0.056	0.492	(-1.553, 1.441)	-0.11	1.000
Gasolina vs Diésel	0.078	0.492	(-1.419, 1.575)	0.16	1.000
Humimax Plus® vs Diésel	-1.263	0.492	(-2.760, 0.234)	-2.57	0.138
Humimax Plus® vs Gasolina	-1.341	0.492	(-2.838, 0.156)	-2.72	0.100

Tabla 3. Resultados desglosados del análisis de medias por grupo mediante la prueba de Tukey

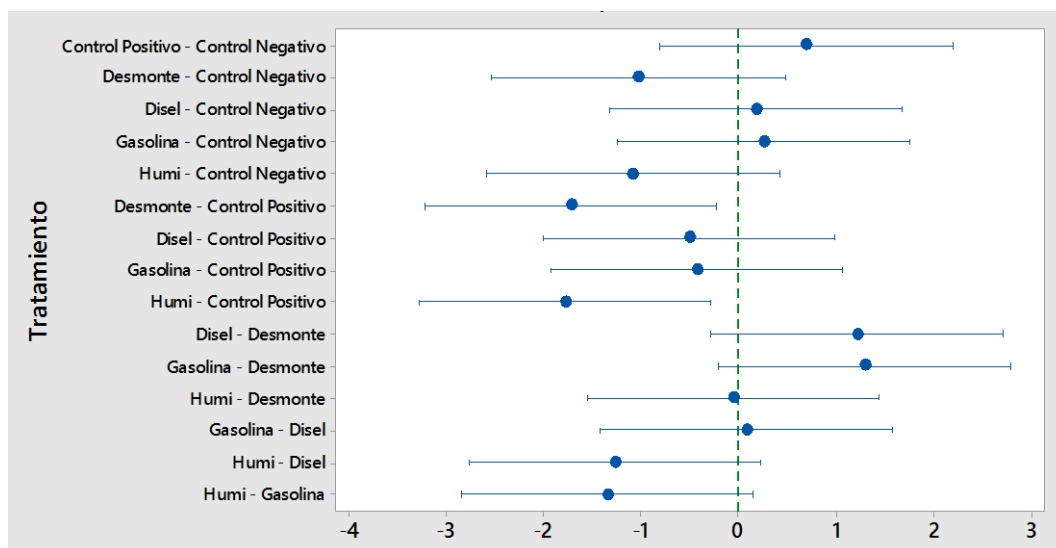


Figura 12. Diferencias de las medias para Log₁₀ UFC/mL al 1%, con 95% de confianza. Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

Crecimiento de *P. putida* KT2440 en medio M9 con hidrocarburos y agroquímicos al 4%

El cultivo con citrato de sodio (control positivo pero ahora con 8 g/L) mostró el mejor crecimiento, ya que inició con 5.46 Log₁₀ UFC/mL y alcanzó 7.20 Log₁₀ UFC/mL después de 24 h de cultivo y se mantuvo en ese orden hasta las 72 h (Figura 11); seguido del cultivo con el hidrocarburo diésel que aumentó un orden de magnitud (de 5.574 a 6.48 Log₁₀ UFC/mL) en 24 h y se mantuvo en ese orden hasta las 72 h, en tercer lugar, el fertilizante Humimax Plus® partió con una población de 5.481 Log₁₀ UFC/mL, el valor más alto se registró a las 24 horas (6.08 Log₁₀ UFC/mL) y posteriormente la población comienza a disminuir progresivamente (Figura 11). El hidrocarburo gasolina inició con una población de 5.535 Log₁₀ UFC/mL y disminuyó medio orden de magnitud después de 72 h, el herbicida Desmote-4EB® que inició con una población de 5.2 Log₁₀ UFC/mL y disminuyó a 4 Log₁₀ UFC/mL después de 72 h (Figura 13).

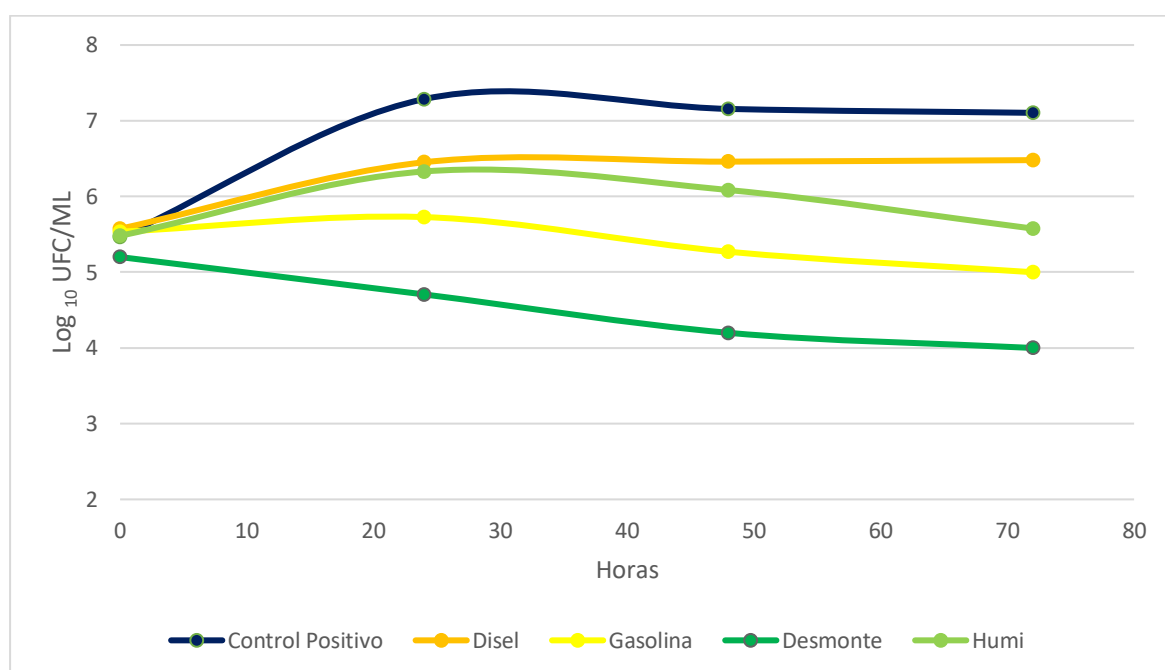


Figura 13. Gráfica de crecimiento bacteriano con los hidrocarburos y herbicidas al 4%, Se utilizó el método de Drop plate para cuantificar la población bacteriana. La El control positivo utilizó como fuente de carbono al citrato de sodio; es el control Positivo, los tratamientos con hidrocarburos: Diésel y Gasolina, los agroquímicos: Humimax Plus® y Desmote-4EB®.

Prueba de normalidad de los valores de Log_{10} UFC/mL para cada uno de los tratamientos cuando los hidrocarburos y agroquímicos están al 4%

La prueba de Anderson-Darling mostró que los datos son normales, comparando la función de ECDF de los datos de la muestra (Log_{10} UFC/mL). Como se puede observar en la Figura 14, los datos son normales, ya que se obtuvo un valor $p = 0.089$ que es mayor que el nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), por lo que los datos siguen una distribución normal **(Figura 14)**.

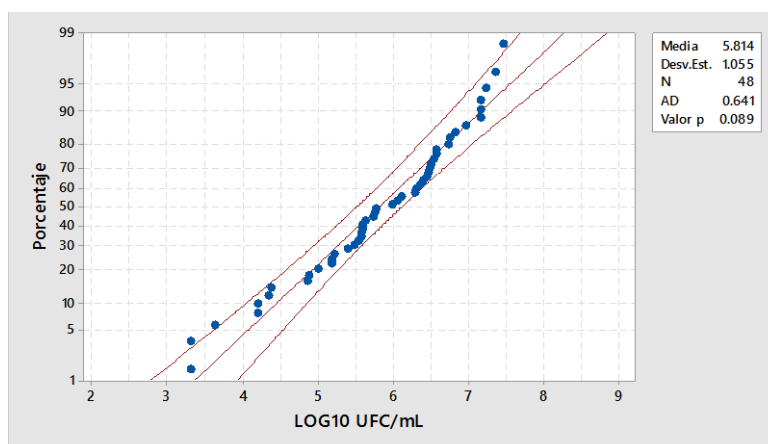


Figura 14. Resultados de la prueba de normalidad de Log_{10} UFC/mL al 4%, con 95% de confianza, los datos se ajustan a la distribución normal. N= número de datos analizados, AD: Anderson-Darling, Desv.Est: Desviación estándar.

Prueba de MANOVA de los valores de Log_{10} UFC/mL agrupados por fuente de carbono o por el tiempo de la medición

En el análisis MANOVA se obtuvieron los siguientes resultados. Los valores de Log_{10} UFC/mL se agruparon dependiendo de la fuente de carbono o del tiempo de medición, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. **(Tabla 4)**.

Fuente	GL	SC	MC	Valor	Valor
		Ajust.	Ajust.	F	p
Tratamiento	5	32.198	6.4395	17.66	0.000
Horas	3	7.042	2.3472	6.44	0.002
Tratamiento*Horas	15	4.335	0.2890	0.79	0.674
Error	24	8.751	0.3646		
Total	47	52.326			

Tabla 4. Resultados del análisis de MANOVA utilizando la fuente de carbono al 4% (v/v). Grados de libertad (GL), Suma de Cuadrados Ajustada (SC Ajust.).

Los grupos presentaron diferencias significativas cuando se compararon por la hora de la evaluación del crecimiento ($p < 0.05$). Sin embargo, cuando se compararon los grupos mediante la interacción de ambas variables (fuente de carbono y las horas de crecimiento) no tienen diferencias significativas (Figura 15).

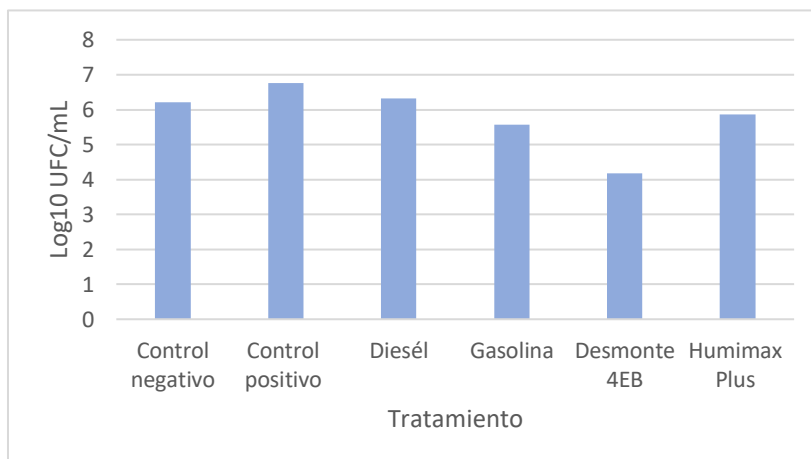


Figura 15. Grafica de comparación de medias utilizando los tratamientos al 4%

Comparación de medias de Log₁₀ UFC/mL por grupos mediante la prueba de Tukey

La tabla 5 muestra el análisis de las medias de Log₁₀ UFC/mL de los diferentes grupos experimentales. Las medias tienen diferencias estadísticas si los tratamientos tienen diferente letra. El control positivo, el grupo con Gasolina y Desmorte® poseen solo una agrupación lo que sugiere que si hay diferencia entre ellos. El grupo Diésel, control negativo y Humimax Plus®, no poseen diferencias significativas dado que comparten una letra. Esto se reafirma en la Tabla 6 donde vemos el desglose de las comparaciones por tratamientos Desmorte® respecto al grupo control negativo ($p < 0.05$) Desmorte® respecto al control positivo ($p < 0.05$), Gasolina respecto al control positivos ($p = 0.007$), Diésel respecto a Desmorte® ($p < 0.05$), Gasolina respecto a Desmorte® ($p = 0.02$) y por último Humimax Plus® respecto a Desmorte® ($p < 0.05$) (**Tabla 6, Figura 16**).

Tratamiento	N	Media	Agrupación	
Control Positivo	8	6.753	A	
Disel	8	6.320	A	B
Control Negativo	8	6.203	A	B
Humimax	8	5.868	A	B
Gasolina	8	5.561	B	
Desmonte	8	4.181	C	

Tabla 5. Resultados del análisis de la prueba de Tukey: Tratamientos al 1%

Diferencia de Tratamiento niveles	Diferencia de medias	EE de diferencia	IC de 95% simultáneo	Valor T	Valor p ajustado
control positivo vs control negativo	0.550	0.302	(-0.383, 1.483)	1.82	0.472
Desmonte® vs control negativo	-2.023	0.302	(-2.956, -1.090)	-6.70	0.000
Disel vs control negativo	0.117	0.302	(-0.816, 1.050)	0.39	0.999
Gasolina vs control negativo	-0.643	0.302	(-1.576, 0.290)	-2.13	0.307
Humimax Plus® vs control negativo	-0.335	0.302	(-1.268, 0.598)	-1.11	0.872
Desmonte® vs control positivo	-2.572	0.302	(-3.505, -1.639)	-8.52	0.000
Disel vs control positivo	-0.433	0.302	(-1.366, 0.500)	-1.43	0.707
Gasolina vs control positivo	-1.192	0.302	(-2.125, -0.259)	-3.95	0.007
Humimax Plus® vs control positivo	-0.885	0.302	(-1.818, 0.048)	-2.93	0.070
Disel –vs Desmonte®	2.140	0.302	(1.207, 3.072)	7.09	0.000
Gasolina –vs Desmonte®	1.380	0.302	(0.447, 2.313)	4.57	0.002
Humimax Plus® vs Desmonte®	1.688	0.302	(0.755, 2.621)	5.59	0.000
Gasolina – Disel	-0.759	0.302	(-1.692, 0.174)	-2.52	0.159
Humimax Plus® - Disel	-0.452	0.302	(-1.385, 0.481)	-1.50	0.670
Humimax Plus® - Gasolina	0.308	0.302	(-0.625, 1.241)	1.02	0.907

Tabla 6. Resultados desglosados del análisis de la prueba de Tukey

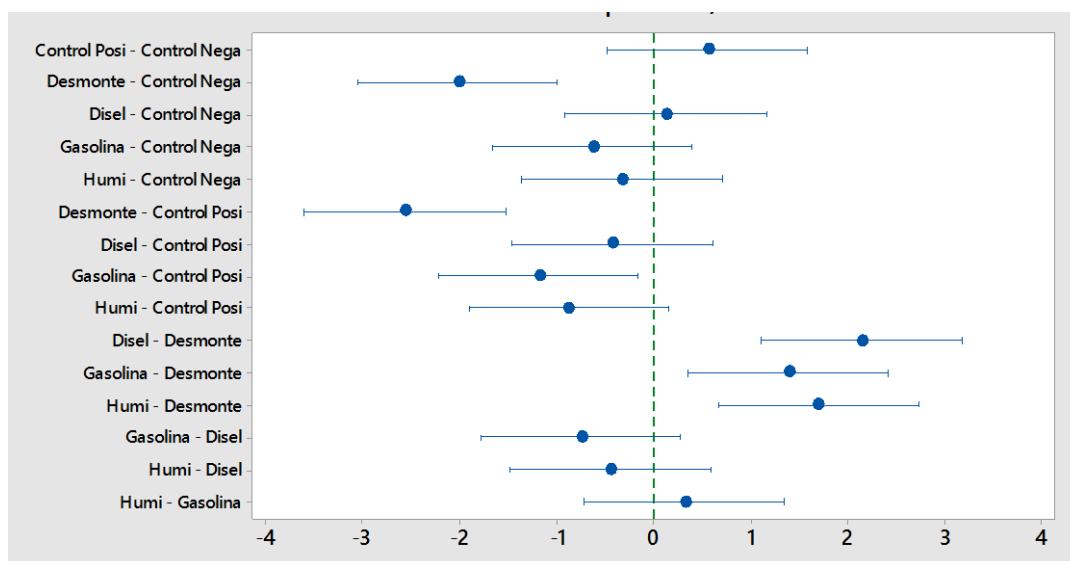


Figura 16. Diferencias de las medidas para Log₁₀ UFC/mL al 4%, con 95% de confianza. Si un intervalo no contiene cero, las medidas correspondientes son significativamente diferentes.

En el tratamiento con citrato de sodio (Control Positivo) al 1% se observó la fase logarítmica en las primeras horas de crecimiento hasta alcanzar el pico máximo a las 72 horas, en comparación del crecimiento bacteriano cuando se utiliza diésel vemos, que la fase logarítmica inicia a las 24 horas y terminó a las 72 horas. Y en el control negativo, la bacteria sobrevive las primeras 48 horas e incrementa la población un medio orden de magnitud. Al incrementar cuatro veces la concentración del citrato de sodio (de 2 g/L a 8 g/L) la fase logarítmica se inicia desde el principio y culmina a las 24 horas, la fase estacionaria se observó desde las 24 y permanece hasta las 72 horas. En el caso del diésel al 4 % la fase logarítmica terminó a las 24 horas (**Figura 17**).

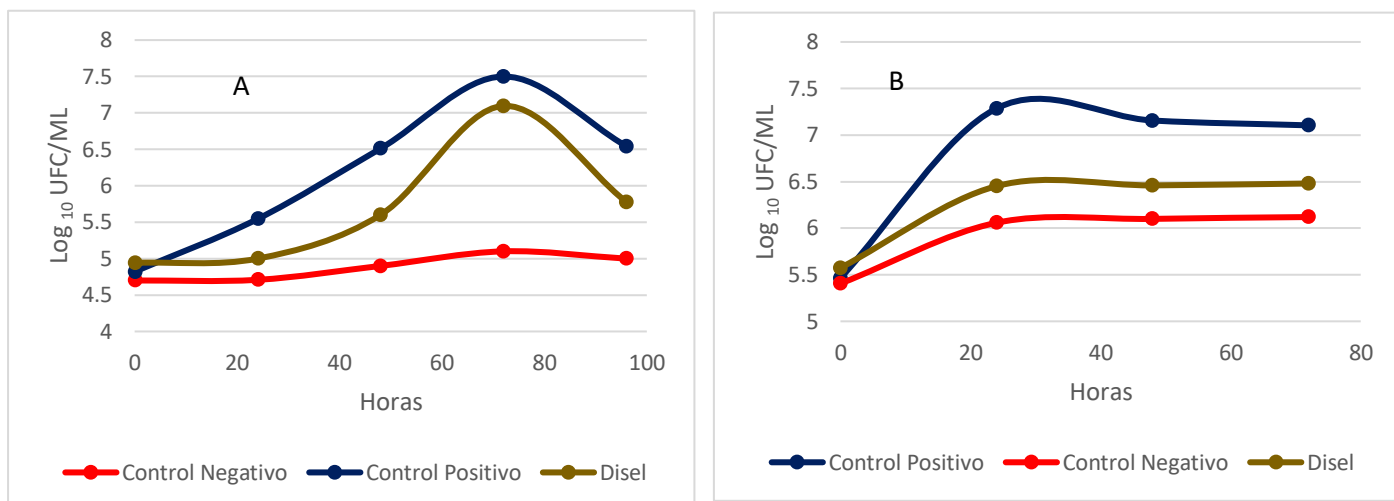


Figura 17 Comparación del crecimiento bacteriano en hidrocarburos. A: Citrato de sodio (Control positivo) y Diésel al 1%, hasta las 96 horas de crecimiento. B: Citrato de sodio y Diésel al 4%, hasta las 72 horas de crecimiento. Control negativo (sin fuente de carbono).

El cultivo con la fuente de carbono gasolina al 1% alcanzó la población máxima a las 48 horas y en ese momento inició la fase estacionaria, la población obtenida con esta fuente de carbono es un orden y medio menor en comparación con la población obtenida con citrato de sodio; por otro lado, se muestra que el hidrocarburo gasolina al 4% resulta estresante, ya que restringe el crecimiento bacteriano, a partir de las 24 horas se observa la disminución de la población a lo largo del tiempo (**Figura 18**).

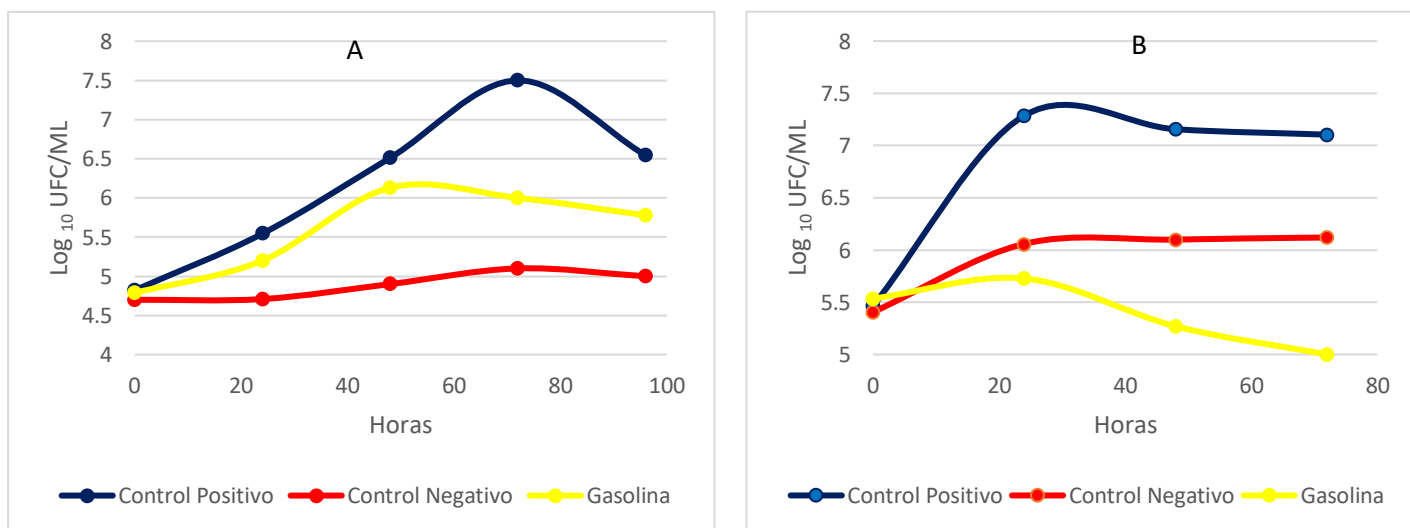


Figura 18. Comparación del crecimiento bacteriano en hidrocarburos. A: Citrato de sodio (Control positivo) y Gasolina al 1%, hasta las 96 horas de crecimiento. B: Citrato de sodio y Gasolina al 4%, hasta las 72 horas de crecimiento. Control negativo (sin fuente de carbono).

El herbicida Desmote 4EB® utilizado como fuente de carbono al 1%, resulta tóxico para las bacterias como se observa en las gráficas (**Figura 19**), a las 24 horas la población disminuye un orden de magnitud, posteriormente la población bacteriana presenta supervivencia al herbicida dado que la población se mantiene constante. De forma similar al aumentar la concentración al 4% de Desmote 4EB® resulta tóxico para las bacterias, ya que disminuye su población a medida que transcurre el tiempo (**Figura 19**).

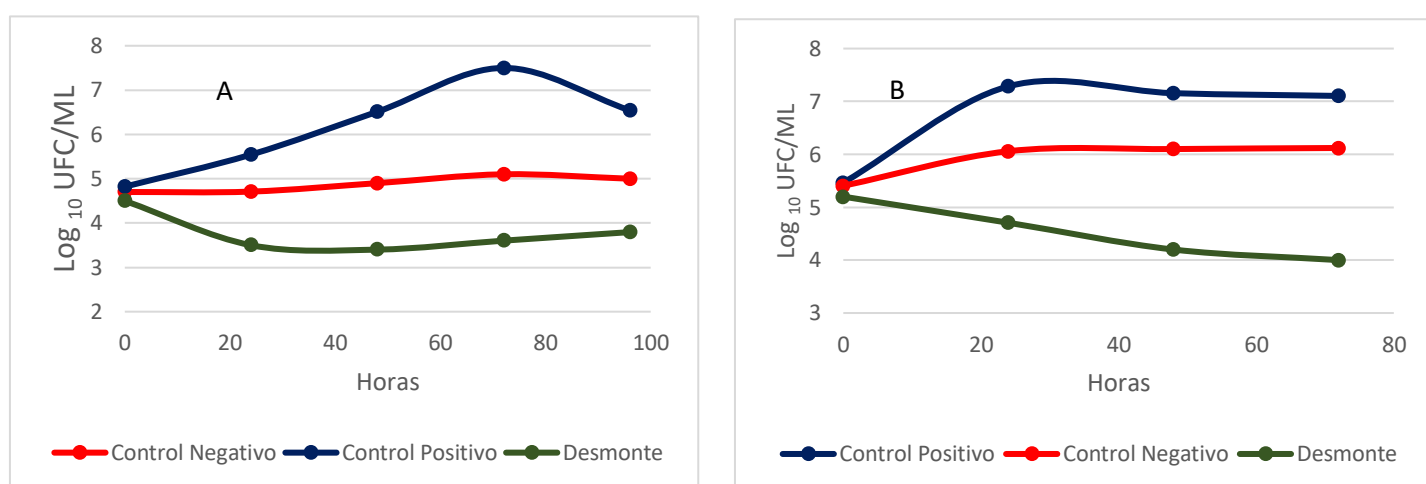


Figura 19. Comparación del crecimiento bacteriano con agroquímicos. A: Citrato de sodio (Control positivo) y Desmote 4EB al 1%, hasta las 96 horas de crecimiento. B: Citrato de sodio y Desmote 4EB al 4%, hasta las 72 horas de crecimiento. Control negativo (sin fuente de carbono)

Los resultados muestran que Humimax Plus® al 1% fue utilizado como fuente de carbono por la bacteria, ya que la población aumentó de 4.8 Log₁₀ UFC/mL a 5.8 Log₁₀UFC/mL a las 72 h, tiempo en el que termina la fase logarítmica, posterior a las 72 horas disminuye la población bacteriana drásticamente. El aumento de la concentración al 4% del agroquímico permite el crecimiento bacteriano en 0.9 Log₁₀ UFC/mL y se observó el término de la fase logarítmica a las 24 horas, posterior a las 24 horas se observó la disminución de la población bacteriana (**Figura 20**).

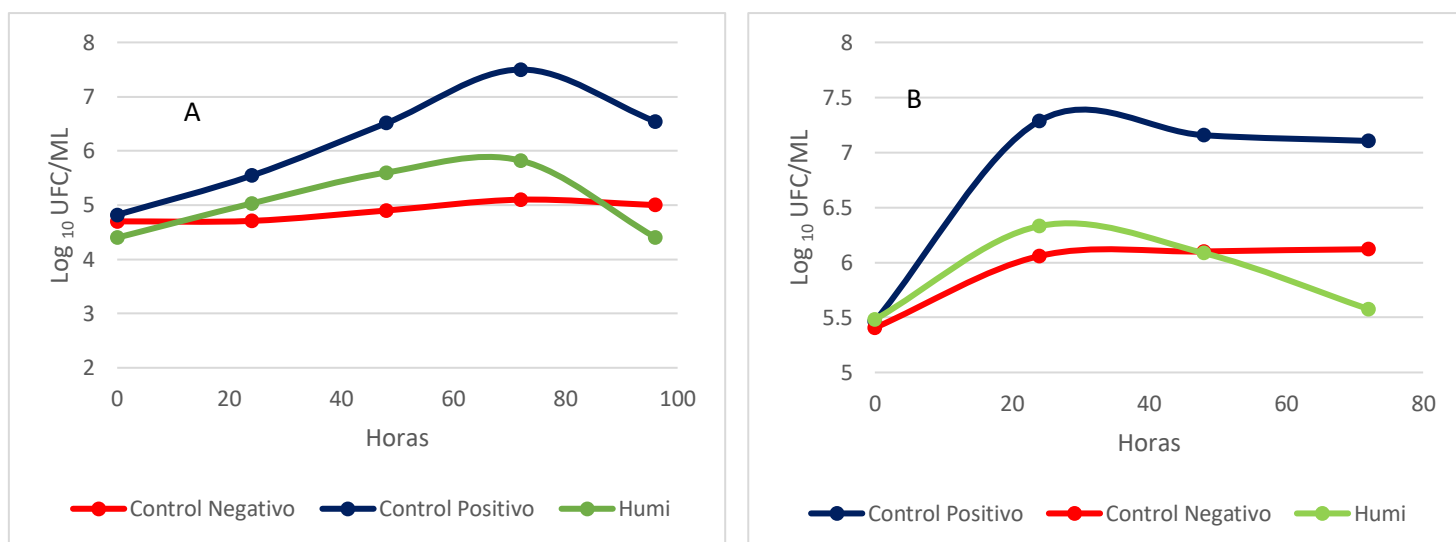


Figura 20 Comparación del crecimiento bacteriano con agroquímicos. A: Citrato de sodio (Control positivo) y Humimax al 1%, hasta las 96 horas de crecimiento. B: Citrato de sodio y Humimax al 4%, hasta las 72 horas de crecimiento. Control negativo (sin fuente de carbono)

El análisis de la capacidad de *P. putida* KT2440 para degradar las fuentes de carbono mediante espectrofotometría utilizando hidrocarburos y agroquímicos al 1% , mostró algunas limitantes, sobre todo con los agroquímicos (ver espectros de barrido en Figuras 6 y 7 de materiales y métodos). Sólo con gasolina se encontró un pico de absorción bien definido a los 260 nm (Figura 5, materiales y métodos). Las mediciones de absorbancia a 260 nm en los cultivos con gasolina y diésel mostraron una disminución a las 24 h, después de ello se detiene el consumo. Esta misma tendencia la observamos en diésel (**Figura 21**).

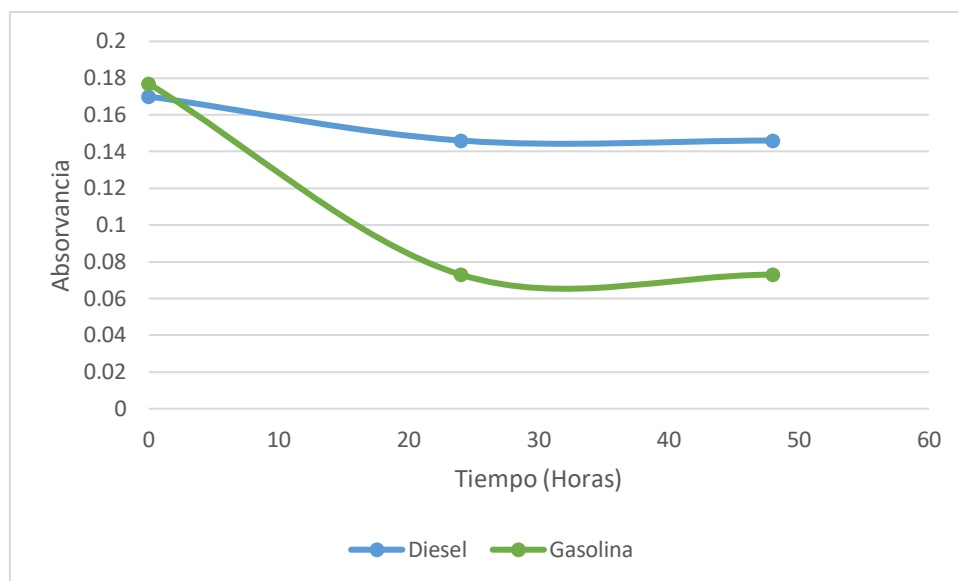


Figura 21. Curva de degradación de las diferentes fuentes de carbono en relación con el tiempo, donde se observa una disminución de absorbancia conforme transcurre el tiempo.

El tratamiento con gasolina mostró un 58.8. % de degradación (**Figura 19**).

Monitoreo del consumo de hidrocarburos por Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de Masas (CG-EM)

En los experimentos donde *P. putida* KT2440 creció en presencia de diésel al 4%, se realizó el perfil cromatográfico de gases masa donde se mostró como a las 72 h de cultivo se disminuyeron algunos picos de los componentes del diésel (**figura 22**). *P. putida* KT2440 logró disminuir la presencia de los siguientes componentes del Diésel:

- Pico eluido a los 3.93 minutos, cuya identidad con el compuesto o -xileno es del 95%.
- Pico eluido a los 4.3 minutos, cuya identidad con el compuesto 1,3 - dimetil-benceno es del 92%.
- Pico eluido a los 4.8 minutos, cuya identidad con el compuesto 1- etil-3 metil benceno es del 95%.
- Pico eluido a los 5.1 minutos, cuya identidad es 97% compatible con el compuesto 1, 2,4 – trimetil benceno.
- Pico eluido a los 6.050 minutos, cuya identidad es un 95% compatible con el compuesto 2-etil-1,4-dimetil benceno.
- Pico eluido a los 6.125 minutos, cuya identidad es un 97% compatible con el compuesto 2-etil-1,4-dimetil benceno.

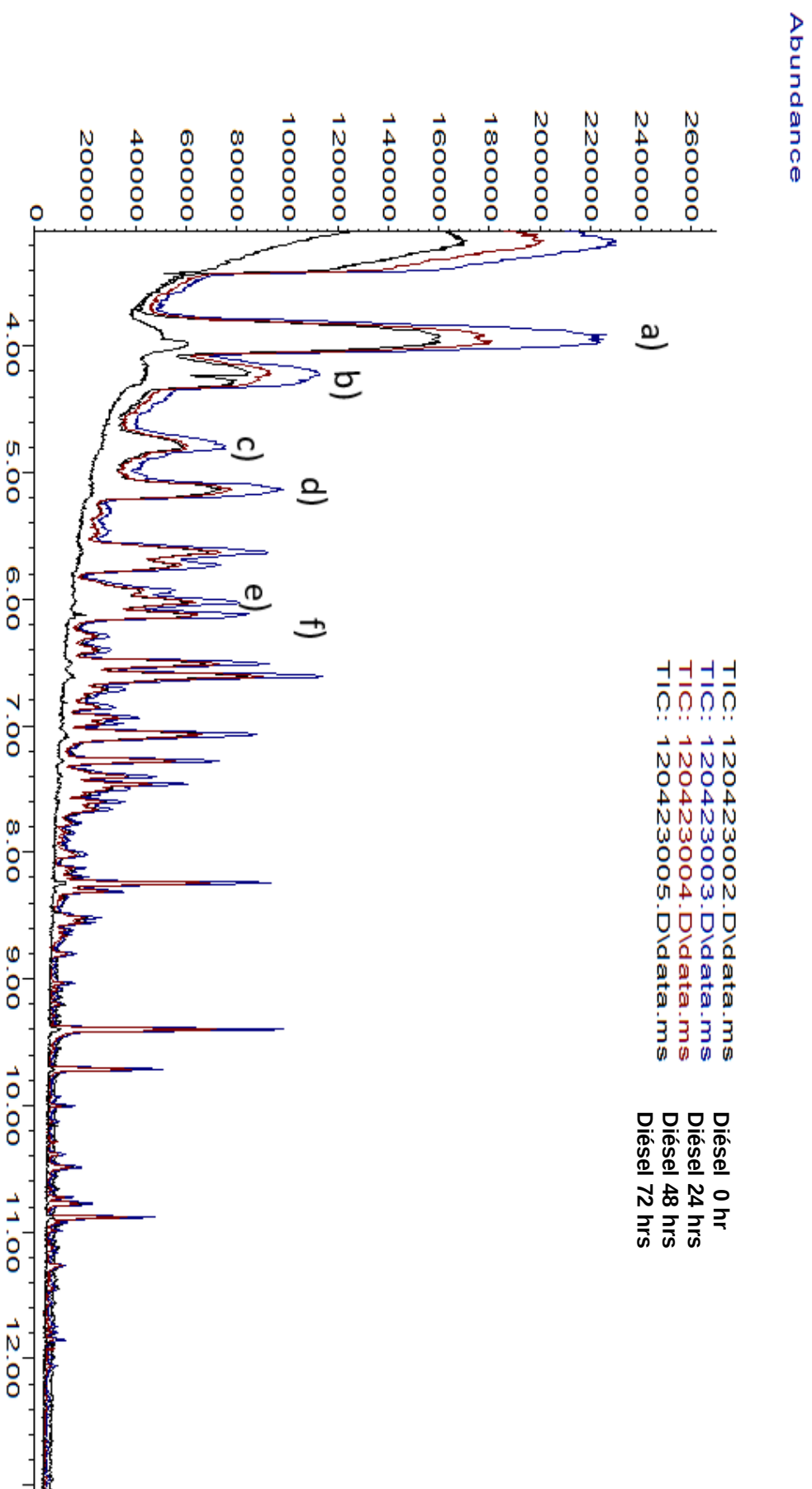


Figura 22. Cromatografía de gases masa del cultivo de *P. putida* KT2440 con fuente de carbono Diésel al 4%.

En cuanto al consumo de compuestos presentes en el hidrocarburo gasolina, no se observaron cambios significativos en el perfil cromatográfico **(Figura 23)**.

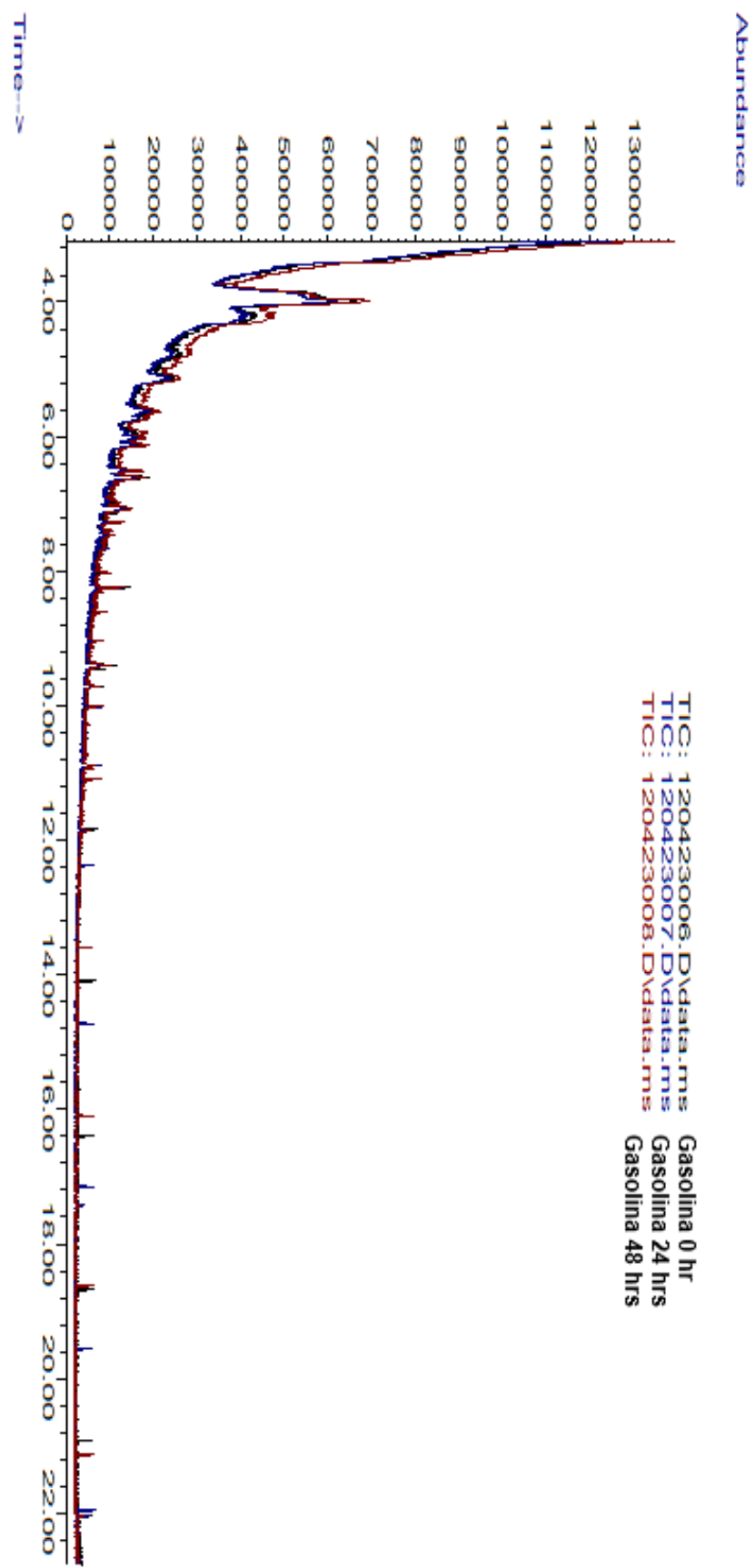


Figura 23. Cromatografía de gases masa del cultivo de *P. putida* KT2440 con fuente de carbono de gasolina al 4%

Discusión

La contaminación ambiental causada por xenobióticos es una problemática primordial, y se requiere utilizar alternativas ecológicas para mitigar esta contaminación, como la biorremediación (Bracho *et al.*, 2004). Por lo que en este trabajo se seleccionó a *P. putida* KT2440 para estudiar su capacidad metabólica para utilizar como fuente de carbono hidrocarburos como: Diésel y gasolina; así como los agroquímicos Desmote 4EB® y Humimax Plus®.

En este trabajo observamos que la bacteria fue capaz de crecer en presencia de gasolina, diésel y Humimax Plus® al 1%, con un incremento de la población bacteriana similar a lo observado con citrato de sodio, que es la fuente de carbono preferida por esta bacteria. El crecimiento en citrato incrementó casi tres órdenes de magnitud en comparación con la población inicial; seguida del hidrocarburo Diésel, que aumentó dos órdenes de magnitud, el tercer lugar de crecimiento bacteriano se observó con la gasolina. Así mismo, con el fertilizante Humimax Plus® la población bacteriana incrementó un orden de magnitud, lo que sugiere que la bacteria se adaptó a la presencia del compuesto agroquímico y lo utilizó como fuente de carbono. El compuesto Desmote-4EB® generó toxicidad a *P. putida* KT2440 a las 24 horas, porque la población disminuyó un orden de magnitud, esta tendencia contrasta a lo observado en el control negativo (sin fuente de carbono) donde la población se mantiene constante a lo largo del tiempo; a las 24 horas la bacteria posiblemente se adaptó al 1% de Desmote® y ya no siguió disminuyendo la población (Figura 10).

En cuanto a los experimentos con fuente de carbono al 4%, el control positivo con citrato de sodio aumentó su población en 2 órdenes de magnitud, seguida del hidrocarburo Diésel, que aumentó un orden de magnitud con respecto a la población inicial (Figura 13). Sin embargo, cuando la bacteria crece en presencia de gasolina 4% y del fertilizante Humimax Plus® al 4%, la población incrementó discretamente medio orden de magnitud a las 24 horas de cultivo, posterior a las 24 horas de estar en contacto con estos compuestos, esta condición resultó tóxica para la bacteria, puesto que se observó una disminución de la población a lo largo del tiempo. Aún más tóxico resultó Desmote-4EB®, ya que la población bacteriana disminuyó en presencia de Desmote desde el primer contacto con el herbicida (Figura 13).

En este trabajo se observó que *P. putida* KT2440 puede crecer en presencia de gasolina y Diésel al 1%, así como Diésel al 4%, lo cual coincide con lo reportado por

García 2009, donde ellos demostraron que *P. putida* KT2440 activa una mayor cantidad de bombas tolerantes al tolueno en comparación con DOT-T1E, y ambas cepas inducen modificaciones en la membrana para disminuir la permeabilidad al tolueno. La cepa *P. putida* KT2440 activa el ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA) para generar energía, y evita procesos energéticamente costosos, como la biosíntesis flagelar. Esto indica que *P. putida* KT2440 responde al tolueno centrándose en los mecanismos de supervivencia. En cambio, la cepa DOT-T1E activa las vías de degradación del tolueno, utilizando este compuesto como fuente de energía.

Asimismo, Duque y colaboradores (2022) mostraron que *P. putida* KT2440 tiene la capacidad de sobrevivir en un ambiente contaminado con tolueno; esta bacteria contiene al plásmido TOL autotransmisible; el cual permite la metabolización del tolueno y los xilenos, para incluirlos al metabolismo central. Sus resultados mostraron que *P. putida* KT2440 (pWW0) utilizó el octano como única fuente de carbono, por consiguiente, tras adquirir un conjunto de genes relacionados con el metabolismo del octano (que codifican las enzimas: alcano-monooxigenasa, una alcohol-deshidrogenasa y una aldehído-deshidrogenasa dependiente de PQQ), utilizó la rubredoxina-reductasa para oxidar el octano a octanol, octanal y ácido octanoico; este último se acila y oxida para producir acetil-CoA, que se asimila a través de la vía del glioxilato.

La vía Tol es otra ruta metabólica que se encarga de la degradación de xenobióticos como el tolueno, Domínguez y colaboradores (2006) estudiaron que *P. putida* KT2440 censa al tolueno como un nutriente potencial, así como un agente oxidante de proteínas y un compuesto tóxico que daña la membrana y se requiere expulsarlo de la célula. Cada una de estas entradas requiere una respuesta transcripcional diferente, donde se involucran una gran cantidad de genes, algunos de estos genes son expresados por la bacteria para soportar el estrés general, y sólo una pequeña parte de la expresión génica se dirige a la degradación de los compuestos aromáticos (genes *xyI*).

Por esta razón, en este trabajo se sugiere que *P. putida* KT2440 puede percibir la presencia de aromáticos en su entorno, como compuestos que representan un factor estresante, antes que como una fuente de carbono cuando las concentraciones superan el 1% (Figura 17), y dado que los compuestos aromáticos inhiben varias funciones de la bacteria (oxidación de proteínas con actividad enzimática y

estructural), se podría compensar activando genes involucrados con la tolerancia al estrés, lo que para la bacteria representaría un costo menor en términos de energía. De igual manera, se evaluó la capacidad de *P. putida* KT2440 para tolerar el compuesto 2,4 diclorofenoxiacético que es el compuesto activo del herbicida Desmonte 4EB®. Los resultados mostraron que el herbicida al 1% y 4% disminuyeron la población bacteriana sugiriendo que la bacteria no es capaz de degradarlo ni tolerarlo, similar a lo reportado por Parra Verdugo (2020), donde la cepa *P. putida* KT2440 no fue capaz de degradar ni 2,4 diclorofenoxiacético ni Atrazina.

Parra Verdugo (2020) realizó ensayos de conjugación entre las cepas donadoras de plásmidos catabólicos *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (pJP4) y *Pseudomonas* sp. ADP (pADP-1) hacía las cepas receptoras *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. RG8. El plásmido pJP4 contiene los genes que codifican para las enzimas que degradan al plaguicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y el plásmido pADP-1 para las que degradan al plaguicida atrazina. Sólo la cepa transconjugante *P. putida* KT2440 (pADP-1) (T) pudo degradar atrazina, pero la transconjugante *P. putida* KT2440 (pJP4) (T) no pudo degradar al 2,4-D.

Asimismo, en este trabajo, cuando se utilizó a Desmonte (2,4-D) como fuente de carbono al 4%, tuvo un descenso drástico de la población bacteriana en comparación con el cultivo sin fuente de carbono (Control negativo).

También, en este trabajo se evaluó el metabolismo de *P. putida* KT2440 para emplear a Humimax Plus® al 1% como fuente de carbono, se observó crecimiento bacteriano a las 24 horas, lo que sugiere *P. putida* KT2440 degradó los compuestos húmicos, los cuales son componentes activos del agroquímico, y esto es sustentado por que *P. putida* KT2440 se ha documentado como una bacteria saprofita (Nitschel et al., 2020). En cuanto a la degradación de los hidrocarburos al 1%, se observó que *P. putida* KT2440 es capaz de degradar un 58.8 % la gasolina teniendo una concentración final de 0.58 % (v/v) determinado mediante espectrofotometría. Esto concuerda con lo investigado por Bracho y Soto (2011), donde evaluaron la capacidad de 14 cepas de *Pseudomonas* para degradar hidrocarburos aromáticos dicíclicos, tricíclicos y heterocíclicos que constituyen la fracción aromática del petróleo. El 78.57% de las cepas degradó fenantreno, el 71.42% dibenzotiofeno y el 50% los cuatro hidrocarburos. Esto sugiere que *P. putida* KT2440 presentó enzimas para degradar algunos constituyentes de la fracción aromática del petróleo.

En este trabajo también se exploró la degradación de hidrocarburos al 4% mediante el análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas, y se detectó la remoción de aromáticos en Diésel por la actividad metabólica de *P. putida* KT2440, los componentes que la bacteria degradó fueron: o-xileno, 1,3 – dimetil-benceno, 1- etil-3 metil benceno, 1, 2,4 –trimetil benceno, 2-etil-1,4-dimetil benceno y el compuesto 2-etil-1,4-dimetil benceno (Figura 23). Por lo que los componentes del diésel que *P. putida* KT2440 degradó, concuerda con la composición de este hidrocarburo reportada por Dahalan (2007), y afirmó que el diésel contiene benceno, el tolueno, el xileno, naftaleno y algunos aromáticos polinucleares. Asimismo, El Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos (HHS) (1999) mencionó que el diésel está conformado por el 75% de hidrocarburos saturados y 25% por aromáticos.

De igual forma, la capacidad metabólica de *P. putida* KT2440 ante los compuestos aromáticos identificados por este estudio concuerdan con lo reportado por Domínguez y Rosales (2023), quienes evaluaron la capacidad de *P. aeruginosa* para degradar el tolueno, sus resultados mostraron que la bacteria biodregadó el 98 % de este aromático. Asimismo, el estudio realizado por Braibant-Wayens (2004) reportó que cepas de *P. putida* metabolizaron el tolueno, incluso algunas cepas degradaron el benceno y el xileno. Esta capacidad de degradación es sustentada por la presencia de oxigenasas que catalizan las etapas iniciales de la degradación de estos hidrocarburos en condiciones aerobias.

Conclusiones

En este estudio se demostró que *P. putida* KT2440 puede metabolizar hidrocarburos y el agroquímico Humimax Plus® al 1%; sin embargo, Desmonte-4EB® resultó tóxico para la bacteria en las dos concentraciones evaluadas (1 y 4%).

P. putida KT2440 fue capaz de degradar compuestos aromáticos de tipo dimetil benceno y o-xileno presentes en el diésel.

Perspectivas

- Evaluar la capacidad de *P. putida* KT2240 para degradar compuestos xenobióticos en ensayos *in- vivo* (plantas).
- Determinar el porcentaje de degradación de cada componente aromático de los hidrocarburos.
- Identificar las enzimas y los metabolitos que utiliza *Pseudomonas putida* KT2240 para degradar los hidrocarburos.

BIBLIOGRAFÍA

- Akintui, M., Alcántara, H., Alva, A., Castillo, H., Huayán, J., & Llenque, L. (2015). *Pseudomonas fluorescens* de suelos agrícolas degradadora del herbicida ácido 2, 4 Diclorofenoxiacético. Revista REBIOLEST, 3(2), 9-13.
- Akintui, M., Alcántara, H., Alva, A., Castillo, H., Huayán, J., & Llenque, L. (2015). *Pseudomonas fluorescens* de suelos agrícolas degradadora del herbicida ácido 2, 4 Diclorofenoxiacético. Revista REBIOLEST, 3(2), 9-13.
- Alonso-Torres, E., Panecatí Bernal, Y., Alvarado-Pulido, J. J., Fuentes-Ramírez, L. E., Martínez-Morales, J., Muñoz-Rojas, J., & Morales-García, Y. E. (2022). Rumbo a la generación de inoculantes en polvo a base de *Pseudomonas putida* KT2440.
- Alvaro, C. E. S., Arocena, L. A., Martínez, M. Á., & Nudelman, N. E. S. (2017). Biodegradación aerobia de fracciones de hidrocarburos provenientes de la actividad petrolera en un suelo de la región Patagonia Norte, Argentina. Revista internacional de contaminación ambiental, 33(2), 247-257.
- Ancayay Leal, V. (2022). Determinación de la presencia del Acido 2, 4 Diclorofenoxiacetico en Cacao en grano (*Theobroma cacao*) para Exportación (Master's thesis).
- Arai, H. (2011). Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in microbiology, 2, 103.
- Arias, J. A. V. (2017). Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. Revista de investigación Agraria y Ambiental, 8(1), 151-167.

- Arriaga-Trejo, A. L., Contreras-López, E., González-Olivares, L. G., Castañeda-Ovando, A., & Nieto-Velázquez, S. (2023). Evaluación espectroscópica del proceso de coagulación de los ácido húmicos en presencia de Fe^{3+} . *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 11(Especial), 111-115.
- Aurora, J. T. N. (2010). Evaluación del efecto de la generación del ácido húmico, ácido fúlvico y humina por la degradación de tres abonos orgánicos para mejorar el suelo de cultivo-inia.
- Baldotto, M. A., & Baldotto, L. E. B. (2014). Ácidos húmicos. *Revista Ceres*, 61, 856-881
- Bautista Carrillo, A. C. (2017). Estandarización de una metodología para la cuantificación de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) por medio de electroforesis capilar en zona (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Belda, E., Van Heck, R. G., José Lopez-Sanchez, M., Cruveiller, S., Barbe, V., Fraser, C., ... & Médigue, C. (2016). The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. *Environmental microbiology*, 18(10), 3403-3424.
- Benavides Lopez de Mesa, J., Quintero, G., Guevara Vizcaino, A. L., Jaimes Caceres, D. C., Gutierrez Riaño, S. M., & Miranda Garcia, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA publ. cient*, 82-90.
- Bera, S. P., & Tank, S. K. (2021). Screening and identification of newly isolated *Pseudomonas* sp. for biodegrading the textile azo dye CI Procion Red H-3B. *Journal of Applied Microbiology*, 130(6), 1949-1959.
- Bermúdez, D. S. (2013). Estudio molecular de poblaciones *Pseudomonas* ambientales (Doctoral dissertation, Universitat de les Illes Balears).
- Bharwad, K., & Rajkumar, S. (2019). Rewiring the functional complexity between Crc, Hfq and sRNAs to regulate carbon catabolite repression in *Pseudomonas*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(9), 1-12.
- Biancucci, G. F., González, D., Pérez, A., Ridolfi, A., & Strobl, A. (2007). Manual de procedimientos analíticos toxicológicos para laboratorios de baja complejidad. Argentina: Asociación Toxicológica Argentina.

- Bracho, M., Díaz, L., & Soto, L. M. (2011). Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas* spp. *Ciencia*, 12(4).
- Braibant-Wayens, C. (2004). Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados.
- Briceño, P. G. D., & Correa, J. C. F. (2016). Identificación de la biodiversidad de microalgal proveniente del Embalse del Muña para evaluar su potencial en biorremediación. *Revista Nova*, 2(1), 36-43.
- Cañizares-Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología-Mexico-*, 42(3), 131.
- Caramutti Godoy, M. R., Mihura, J. B., Ranallo, L. N., Sánchez López, A., Sucari, R. A., & Vásquez, R. G. (2019). Producción de herbicidas formulados a partir de 2, 4-D éster: proyecto de inversión para la incorporación de una línea sintetizadora a una planta formuladora de agroquímicos.
- Concha, R. S. S. (2019). Biorremediación de aguas con metales pesados mediante biomasa microalgal (Doctoral dissertation, Universidad de Valladolid).
- Congiu, E. (2013). Biosurfactantes y biorremediación: Efecto sobre la biodisponibilidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos adsorbidos a suelos (Doctoral dissertation, Universidad de Sevilla).
- Costa-Gutierrez, S. B.-L.-D.-H.-U. (2020). Plant growth promotion by *Pseudomonas putida* KT2440 under saline stress: role of eptA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 10: 4577-4592.
- Dahalan, F. A. (2007). Biodegradation of Diesel by a Locally Isolated *Acinetobacter* Sp (Doctoral dissertation, Universiti Putra Malaysia).
- Das, N., Das, A., Das, S., Bhatawadekar, V., Pandey, P., Choure, K., ... & Pandey, P. (2023). Petroleum Hydrocarbon Catabolic Pathways as Targets for Metabolic Engineering Strategies for Enhanced Bioremediation of Crude-Oil-Contaminated Environments. *Fermentation*, 9(2), 196.
- De Jesús, A. G. (2018). Aislamiento e identificación de una cepa de *Serratia marcescens* degradadora de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D). *Agro Productividad*, 11(4).

- Déley Zárate, A. R. (2012). Biorremediación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Derivados del Patrón del Campamento Sacha-161 Utilizando el Hongo *Pleurotus ostreatus* (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).
- Demling, P., Ankenbauer, A., Klein, B., Noack, S., Tiso, T., Takors, R., & Blank, L. M. (2021). *Pseudomonas putida* KT2440 endures temporary oxygen limitations. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(12), 4735-4750.
- Díaz, E. R., & Guzmán, M. (2004). Características de los fertilizantes para su uso en la fertirrigación. Medios, Agua y Fertilizantes.
- Dominguez Vega, S. Y., & Rosales Lecca, S. F. (2023). Biodegradación de tolueno por *Pseudomonas aeruginosa* en suelos contaminados con derrames de petróleo. Iquitos.
- Domínguez-Cuevas, P., González-Pastor, J. E., Marqués, S., Ramos, J. L., & de Lorenzo, V. (2006). Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *Journal of Biological Chemistry*, 281(17), 11981-11991.
- Duque, E., Udaondo, Z., Molina, L., de la Torre, J., Godoy, P., & Ramos, J. L. (2022). Providing octane degradation capability to *Pseudomonas putida* KT2440 through the horizontal acquisition of oct genes located on an integrative and conjugative element. *Environmental Microbiology Reports*, 14(6), 934-946.
- Duque, E., Udaondo, Z., Molina, L., de la Torre, J., Godoy, P., & Ramos, J. L. (2022). Providing octane degradation capability to *Pseudomonas putida* KT2440 through the horizontal acquisition of oct genes located on an integrative and conjugative element. *Environmental Microbiology Reports*, 14(6), 934-946.
- El-Aziz, Z. K. A., El-Sayed, M. H., & El-Ghany, A. A. A. (2016). Microbial Bioremediation of Lead by Lead-Resistant *Pseudomonas chlororaphis* Strain Hel-KE'-14 Isolated from Industrial Wastewater. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 5(4).
- Ercoli, E., Gálvez, J., Di Paola, M., Cantero, J., Videla, S., Medaura, M., & Bauzá, J. (2001). Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo. Laboratorio de Bioprocesos, reporte especial. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.

- Fan, J., Yang, G., Zhao, H., Shi, G., Geng, Y., Hou, T. y Tao, K. (2012). Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58(4), 263-271.
- Fernández, M., Conde, S., de la Torre, J., Molina-Santiago, C., Ramos, J. L., & Duque, E. (2012). Mechanisms of resistance to chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(2), 1001-1009.
- Fernández, M., Niqui-Arroyo, J. L., Conde, S., Ramos, J. L., & Duque, E. (2012). Enhanced tolerance to naphthalene and enhanced rhizoremediation performance for *Pseudomonas putida* KT2440 via the NAH7 catabolic plasmid. *Applied and environmental microbiology*, 78(15), 5104-5110.
- García Altamirano, V. (2009). Transportadores involucrados en la tolerancia a disolventes orgánicos en *Pseudomonas putida* DOT-T1E.
- Gómez Molina, A. (2021). Degradación de compuestos xenobióticos (Fungicida benomilo) por medio de consorcios bacterianos (Tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).
- González Pérez, DM (2017). Eliminación de xenobióticos de aguas urbanas residuales mediante biorreactores de membrana sumergida.
- GONZALEZ, H. (2009). El humus en la zona cafetera colombiana: Contenido calidad y su relación con algunas propiedades físicas y químicas del suelo. *Cenicafé*.
- Hernandez, A. R. (2009). Estudio del metabolismo del formaldehído en *pseudomonas putida* KT2440 (Doctoral dissertation, Universidad de Granada).
- Ivanova, A. A., Mullaeva, S. A., Sazonova, O. I., Petrikov, K. V., & Vetrova, A. A. (2022). Current research on simultaneous oxidation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by bacteria of genus *Pseudomonas*. *Folia Microbiologica*, 67(4), 591-604.
- Izrael-Živković, L., Beškoski, V., Rikalović, M., Kazazić, S., Shapiro, N., Woyke, T., ... & Karadžić, I. (2019). High-quality draft genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* san ai, an environmental isolate resistant to heavy metals. *Extremophiles*, 23(4), 399-405.

- Jaimes-Díaz, H. G., Suárez-Chacón, I., & Torres-Romero, J. C. (2021). El compostaje: Una alternativa para la recuperación de suelos contaminados por agroquímicos para el pequeño productor. *Ciencias Agropecuarias*, 7(1), 51-67.
- Jiménez Díaz, L. (2022). Metabolismo de ácidos grasos y síntesis de biocombustibles en "*Pseudomonas putida*" (Doctoral dissertation).
- Jiménez, J. I., Miñambres, B., García, J. L., & Díaz, E. (2002). Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology*, 4(12), 824-841.
- Juárez, A., Sanchez, E. M. O., & Gonz, C. A. (2020). ¿ Qué le pasa a mi auto?. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 8(15), 77-81.
- Kahlon, R. S. (2016). Biodegradation and bioremediation of organic chemical pollutants by *Pseudomonas*. *Pseudomonas: Molecular and applied biology*, 343-417.
- Kim, K. H., Jahan, S. A., Kabir, E., & Brown, R. J. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment international*, 60, 71-80.
- Kulkarni, A. G., & Kaliwal, B. B. (2014). Bioremediation of methomyl by soil isolate—*Pseudomonas aeruginosa*. *J Environ Sci, Toxicol Food Technol*, 8(12), 1-10.
- Kumar, V., Shahi, S. K., & Singh, S. (2018). Bioremediation: an eco-sustainable approach for restoration of contaminated sites. In *Microbial bioprospecting for sustainable development* (pp. 115-136). Springer, Singapore.
- La Rosa Caballero, V. I. (2019). Uso de *Pseudomonas* para biorremediar suelos contaminados con plaguicidas organofosforados.
- Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., & García-Valdés, E. (2020). Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus *Pseudomonas*. *Genes*, 11(2), 139.
- López-Cervantes, R., Gallegos-del Tejo, A., Peña-Cervantes, E., Reyes-López, A., Castro-Franco, R., & Chávez-González, J. F. J. (2006). Substancias húmicas de origen diverso en algunas propiedades físicas de un suelo franco-arcillo-limoso. *Terra Latinoamericana*, 24(3), 303-309.
- Martínez-Nieto, P., Bernal-Castillo, J., Agudelo-Fonseca, E., & Bernier-López, S. (2012). Tolerancia y degradación del glifosato por bacterias aisladas de

suelos con aplicaciones frecuentes de roundup sl®. Revista Pilquen• Sección Agronomía, 14(12).

- Meliani, A., & Bensoltane, A. (2014). Enhancement of hydrocarbons degradation by use of *Pseudomonas* biosurfactants and biofilms. Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology, 5(1), 1.
- Méndez, A. S., Méndez, F., Aguirre, G., & Serrano, H. (2008). Disrupción endocrina de la diferenciación sexual. ContactoS, 70, 43-49.
- Mendoza, W. O. R., Pérez, J. J. R., Pacheco, F. A., Rosado, Á. J. Y., Murillo, R. A. L., Burgos, D. Z., ... & Rodríguez, J. A. T. (2017). Ácidos húmicos y su efecto sobre variables morfológicas en plantas de zanahoria (*Daucus carota* L). Biotecnia, 19(2), 25-29.
- Molina-Romero, D., Morales-García, YE, Hernández-Tenorio, AL, Castañeda-Lucio, M., Netzahuatl-Muñoz, AR, & Muñoz-Rojas, J. (2017). *Pseudomonas putida* estimula el crecimiento del maíz en función de la temperatura. Rev Iberoam Ciencias , 4 , 80-88.
- Molina-Santiago, C., Udaondo, Z., Gómez-Lozano, M., Molin, S., & Ramos, JL (2017). Respuesta transcripcional global de cepas de *Pseudomonas putida* sensibles y tolerantes a disolventes expuestas a tolueno. Microbiología ambiental , 19 (2), 645-658.
- Montenegro, S. P., Pulido, S. Y., & Vallejo, L. F. C. (2018). Prácticas de biorremediación en suelos y aguas. Notas de Campus, (1).
- Mulet, M., Gomila, M., Scotta, C., Sánchez, D., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2012). 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*. Systematic and Applied Microbiology, 35(7), 455-464.
- Nitschel, R., Ankenbauer, A., Welsch, I., Wirth, NT, Massner, C., Ahmad, N., ... y Blombach, B. (2020). Ingeniería *Pseudomonas putida* KT2440 para la producción de isobutanol. Ingeniería en Ciencias de la Vida , 20 (5-6), 148-159.
- Noboa Tobar, F. J. (2019). Efecto de la aplicación de tres productos a base de ácidos húmicos y fúlvicos sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la zona de Valencia, Provincia de Los Ríos.

- Olguín, E. J., Hernández, M. E., & Sánchez-Galván, G. (2007). Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(3), 139-154.
- Ortega, A. M. G., & Rivas, E. P. (2003). Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Entner-Doudoroff. *Biotecnología Aplicada*, 20(2), 85-94.
- Palleroni, N. J., & Moore, D. P. E. (2010). 12 Microbiology of Hydrocarbon-Degrading *Pseudomonas*.
- Palomino Pariona, E. (2022). Biorremediación con hongos y bacterias en suelo contaminados con pesticidas 2022: Revisión sistémica.
- Palomo-Rodríguez, M., Viramontes, U. F., Arellano, J. D. J. E., & González, A. R. Comportamiento de la carga nutricional en drenes agrícolas del Valle de Juárez. Jorge Alberto Pérez León (Coordinadores), 7.
- Parra Verdugo, B. I. (2020). Efecto de nanopartículas de cobre sobre la transferencia de genes involucrados en la metabolización bacteriana de plaguicidas.
- Pérez Álvarez, S., Coto Arbelo, O., Echemendía Pérez, M., & Ávila Quezada, G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno?: *Pseudomonas fluorescens*, biological control or pathogen?. *Revista de Protección Vegetal*, 30(3), 225-234.
- Pucci, G., Acuña, A., & Pucci, O. (2015). Biodegradación de hidrocarburos en fondos de tanques de la industria petrolera. *Revista peruana de biología*, 22(1), 97-101.
- Qu, R. Y., He, B., Yang, J. F., Lin, H. Y., Yang, W. C., Wu, Q. Y., ... & Yang, G. F. (2021). Where are the new herbicides?. *Pest Management Science*, 77(6), 2620-2625.
- Raclavská, H., Růžicková, J., Škrobánková, H., Koval, S., Kucbel, M., Raclavský, K., ... & Juchelková, D. (2018). Possibilities of the utilization of char from the pyrolysis of tetrapak. *Journal of Environmental Management*, 219, 231-238.
- Reyes-Pérez, J. J., Rivero-Herrada, M., Andagoya Fajardo, C. J., Beltrán-Morales, F. A., Hernández-Montiel, L. G., García Liscano, A. E., & Ruiz-

Espinoza, F. H. (2021). Emergencia y características agronómicas del *Cucumis sativus* a la aplicación de quitosano, *Glomus cubense* y ácidos húmicos. *Biotecnia*, 23(3), 38-44.

- Rodríguez Eugenio, N., McLaughlin, M., & Pennock, D. (2019). La contaminación del suelo: una realidad oculta.
- Romero, C. L. C. (2023). Biosíntesis de polihidroxialcanoatos dopados con nanopartículas de Plata utilizando glicerol crudo como fuente de carbono y *Pseudomonas* para aplicaciones antimicrobianas.
- Rosado-Flores, M. F., González-Prieto, J. M., Mireles-Martínez, M., Torres-Ortega, J. A., Rosas-García, N. M., & Villegas-Mendoza, J. M. (2020). Identificación de microorganismos aislados de suelos agrícolas con capacidad de tolerar 2,4-D y malatión. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23.
- Rose, M. T., Cavagnaro, T. R., Scanlan, C. A., Rose, T. J., Vancov, T., Kimber, S., ... & Van Zwieten, L. (2016). Impact of herbicides on soil biology and function. *Advances in agronomy*, 136, 133-220.
- Salame-Méndez, A., Gómez-Olivares, J. L., Valencia-Quintana, R., Castro-Campillo, A., Ramírez-Pulido, J., García-Suárez, M. D., & Serrano, H. (2010). Xenobióticos: una paradoja biomédica. Jorge Alberto Pérez León (Coordinadores), 45.
- Sani, R. K., Azmi, W., & Banerjee, U. C. (1998). Comparison of static and shake culture in the decolorization of textile dyes and dye effluents by *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia microbiologica*, 43(1), 85-88.
- Serrano, L. A. R., Castruita, M. Á. S., Cervantes, G. G., Talavera, M. D. C. P., Vidal, J. A. O., & Rangel, P. P. (2015). Influencia de los ácidos fúlvicos sobre la estabilidad de agregados y la raíz de melón en casa sombra. *Interciencia*, 40(5), 317-323.
- Sharma, B., & Shukla, P. (2022). Futuristic avenues of metabolic engineering techniques in bioremediation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(1), 51-60.
- Silva, R. M. P. (2006). Evaluación de un proceso para la biodegradación de hidrocarburos en presencia de metales pesados (Doctoral dissertation, Universidad de Cádiz).

- Suárez, L. Y. C. (2015). Análisis comparativo de curvas de retención de suelos contaminados con gasolina y diésel.
- Sudarsan, S., Dethlefsen, S., Blank, L. M., Siemann-Herzberg, M., & Schmid, A. (2014). The functional structure of central carbon metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and environmental microbiology*, 80(17), 5292-5303.
- Tang, J., Wang, M., Wang, F., Sun, Q., & Zhou, Q. (2011). Eco-toxicate of petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, 23(5), 845-851.
- Téllez, A., Guzmán, S., & Casas, C. (2013). *Termoquímica y combustibles*. Universidad de San Buenaventura, Bogotá.
- Torres Sanchez, B. E. (2013). Bacterias diazótrofes asociadas con leguminosas tropicales con capacidad para tolerar condiciones de estrés ambiental (Doctoral dissertation).
- Trump, B. D., Foran, C., Rycroft, T., Wood, M. D., Bandolin, N., Cains, M., ... & Linkov, I. (2018). Development of community of practice to support quantitative risk assessment for synthetic biology products: Contaminant bioremediation and invasive carp control as cases. *Environment Systems and Decisions*, 38(4), 517-527.
- US Department of Health and Human Services. (1999). Agency for Toxic Substances and Disease Registry-ATSDR.
- Vázquez-Martínez, L. E., & Muñoz-Rojas, J. (2023). *Pseudomonas putida* KT2440, como una potencial bacteria promotora del crecimiento en cultivos agrícolas.
- Velarde Muñoz, P. (2001). Influencia de la adición de enmiendas y residuos orgánicos en el comportamiento de los herbicidas dicamba y 2, 4-D en suelos.
- Walters, J. (1999). Environmental fate of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. Department of pesticide regulations, Sacramento, CA, 18.
- Wang, C. H., Stern, I. J., & Gilmour, C. M. (1959). The catabolism of glucose and gluconate in *Pseudomonas* species. *Archives of biochemistry and biophysics*, 81(2), 489-492.

- Wang, M., Ding, M., & Yuan, Y. (2023). Bioengineering for the Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants. *Bioengineering*, 10(3), 347.
- Yah, R. A. (2018). Biodegradación del (Herbicida) ácido 2, 4-diclorofenoxiacético) mediante bacterias nativas de suelos agrícolas de la comunidad San Víctor en Corozal, Belice.

ANEXO 1

Medio mínimo sales M9

Sales (10 X M9)

X Litro

- KPO_4 70 g/L
- KH_2PO_4 30 g/L
- NaCl 5 g/L
- NH_4Cl 10 g/L

Goodies

- ZnCl_2 5 g/L
- MnCl_2 3 g/L
- H_2BO_3 30 g/L
- CoCl_2 1 mg/ L
- NiCl_2 2mg/L
- NaMoO_4 3 mg/ L

FeCl_3

6 g/L

MgSo_4

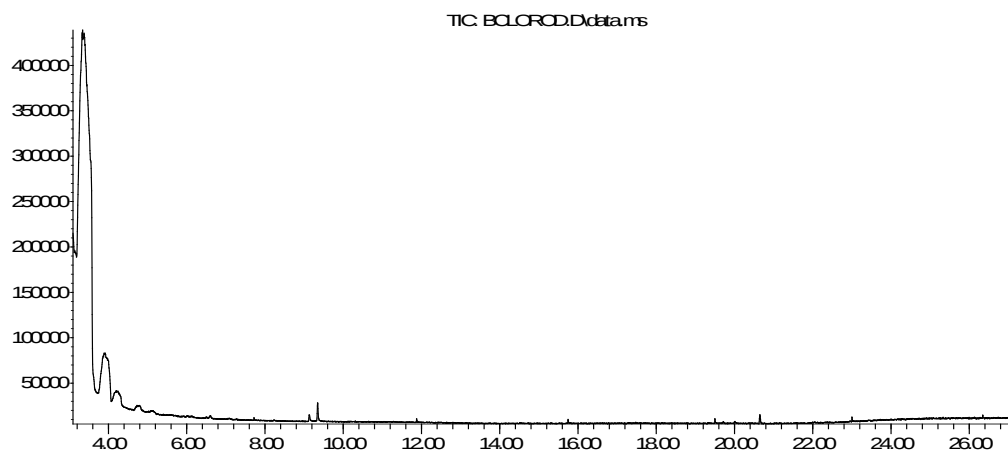
1 molar

ANEXO 2

Cromatografía de gases masa estándar

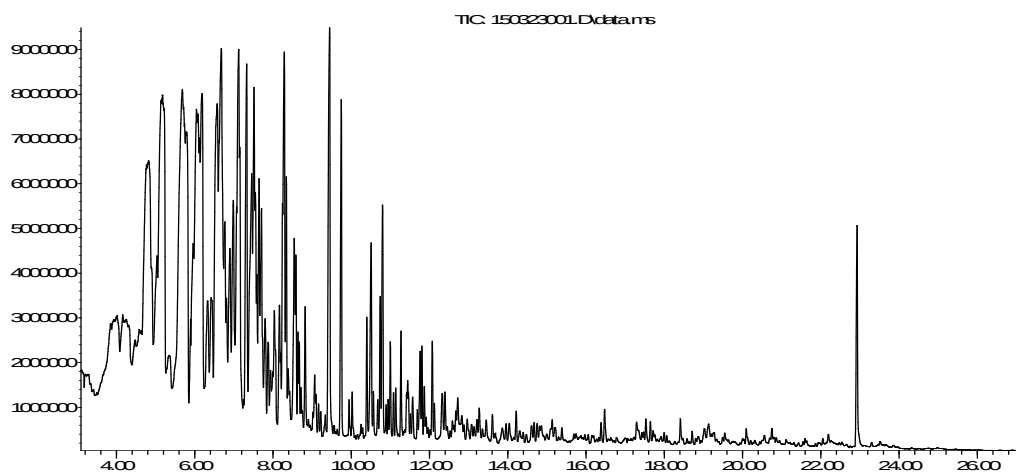
BLANCO DE DICLOROMETANO

Abundance

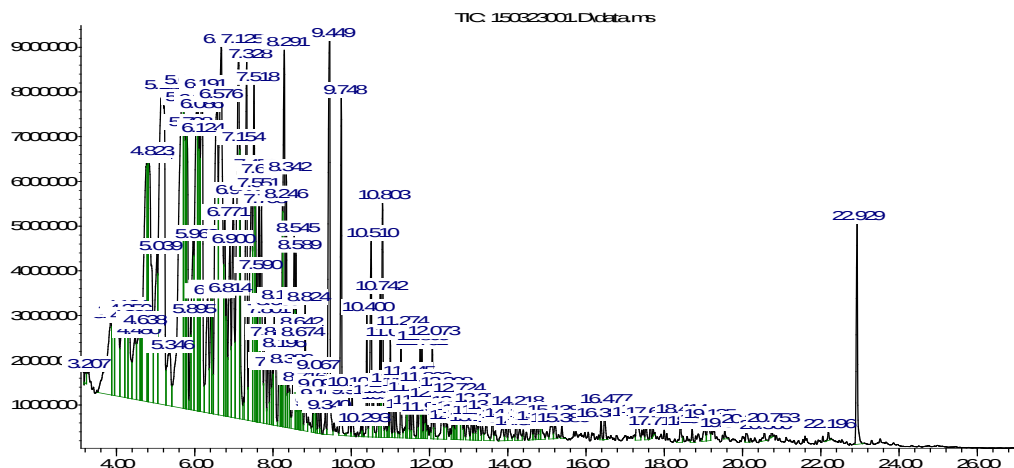


BLANCO DE DIÉSEL

Abundance



Abundance



Time-->

Library Search Report

Data Path : D:\2\DATA\2023\ene23\
 Data File : 150323001.D
 Acq On : 16 Mar 2023 17:46
 Operator : DCA
 Sample : sdt gasolina
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\NIST08.L Minimum Quality:

0

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	3.210	0.06	C:\Database\NIST08.L Hexane, 1-(hexyloxy)-5-methyl- Heptane, 4-ethyl- Hexane, 3-ethyl-4-methyl-	59509 12539 12593	074421-19-5 002216-32-2 003074-77-9	47 38 38
2	3.857	1.34	C:\Database\NIST08.L Benzene, 1,3-dimethyl- o-Xylene Benzene, 1,3-dimethyl-	5055 5031 5057	000108-38-3 000095-47-6 000108-38-3	95 95 95
3	3.932	0.66	C:\Database\NIST08.L o-Xylene Benzene, 1,3-dimethyl- p-Xylene	5031 5055 5036	000095-47-6 000108-38-3 000106-42-3	95 95 94
4	4.012	1.23	C:\Database\NIST08.L o-Xylene Benzene, 1,3-dimethyl- o-Xylene	5031 5055 5039	000095-47-6 000108-38-3 000095-47-6	92 92 91
5	4.162	1.10	C:\Database\NIST08.L Benzene, 1,3-dimethyl- Benzene, 1,3-dimethyl- o-Xylene	5055 5057 5031	000108-38-3 000108-38-3 000095-47-6	86 86 86

6	4.248	0.76	C:\Database\NIST08.L p-Xylene Benzene, 1,3-dimethyl- o-Xylene	5032 000106-42-3 92 5055 000108-38-3 92 5031 000095-47-6 92
7	4.306	0.73	C:\Database\NIST08.L Benzene, 1,3-dimethyl- o-Xylene p-Xylene	5055 000108-38-3 92 5031 000095-47-6 91 5036 000106-42-3 70
8	4.478	0.73	C:\Database\NIST08.L Decane, 3,4-dimethyl- Undecane 1-Decanol, 2-ethyl-	37500 017312-45-7 59 27917 001120-21-4 53 49047 021078-65-9 50
9	4.585	0.71	C:\Database\NIST08.L Decane, 2-methyl- Oxalic acid, isobutyl nonyl ester Undecane, 4,6-dimethyl-	27919 006975-98-0 68 114998 1000309-37-4 64 47655 017312-82-2 64
10	4.611	0.20	C:\Database\NIST08.L Dodecane, 2,6,10-trimethyl- Nonane, 4,5-dimethyl- Decane, 3-methyl-	68990 003891-98-3 58 27930 017302-23-7 49 27921 013151-34-3 49
11	4.638	0.22	C:\Database\NIST08.L Nonane, 4,5-dimethyl- 1-Decene, 3,4-dimethyl- Decane, 3-methyl-	27930 017302-23-7 49 36002 050871-03-9 47 27921 013151-34-3 46
12	4.772	2.68	C:\Database\NIST08.L Benzene, 1-ethyl-3-methyl- Benzene, 1-ethyl-3-methyl- Benzene, 1-ethyl-4-methyl-	9315 000620-14-4 94 9318 000620-14-4 94 9322 000622-96-8 91
13	4.804	0.87	C:\Database\NIST08.L Benzene, 1-ethyl-3-methyl- Benzene, 1-ethyl-4-methyl- Benzene, 1-ethyl-2-methyl-	9315 000620-14-4 95 9316 000622-96-8 94 9314 000611-14-3 93
14	4.825	2.70	C:\Database\NIST08.L Benzene, 1-ethyl-3-methyl- Benzene, 1-ethyl-4-methyl- Benzene, 1-ethyl-2-methyl-	9315 000620-14-4 95 9316 000622-96-8 94 9314 000611-14-3 93
15	5.039	1.51	C:\Database\NIST08.L Benzene, 1-ethyl-2-methyl- Benzene, 1-ethyl-3-methyl- Benzene, 1-ethyl-3-methyl-	9314 000611-14-3 86 9315 000620-14-4 64 9320 000620-14-4 50
16	5.184	6.24	C:\Database\NIST08.L Benzene, 1,2,4-trimethyl- Benzene, 1,3,5-trimethyl- Benzene, 1,2,3-trimethyl-	9312 000095-63-6 97 9309 000108-67-8 97 9310 000526-73-8 97
17	5.344	0.78	C:\Database\NIST08.L Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	14733 000099-87-6 95 14737 000527-84-4 94

			Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	14731	000099-87-6	93
18	5.686	5.32	C:\Database\NIST08.L			
			Benzene, 1-methyl-3-propyl-	14678	001074-43-7	81
			Benzene, 1-methyl-4-propyl-	14679	001074-55-1	81
			Benzene, 1-methyl-3-propyl-	14680	001074-43-7	76
19	5.718	1.76	C:\Database\NIST08.L			
			3a,6-Methano-3aH-indene, 2,3,4,5,6,7-hexahydro-	14764	098640-10-9	80
			Benzene, 1-methyl-3-propyl-	14678	001074-43-7	64
			Benzene, 1-methyl-4-propyl-	14679	001074-55-1	64
20	5.783	0.96	C:\Database\NIST08.L			
			Benzene, 2-ethyl-1,4-dimethyl-	14711	001758-88-9	94
			Benzene, 2-ethyl-1,4-dimethyl-	14714	001758-88-9	94
			Benzene, 1-ethyl-3,5-dimethyl-	14707	000934-74-7	94
21	5.799	1.44	C:\Database\NIST08.L			
			Benzene, 2-ethyl-1,4-dimethyl-	14711	001758-88-9	97
			Benzene, 2-ethyl-1,4-dimethyl-	14714	001758-88-9	94
			Benzene, 1-ethyl-2,3-dimethyl-	14708	000933-98-2	94
22	5.895	0.32	C:\Database\NIST08.L			
			Benzene, 1-methyl-4-propyl-	14679	001074-55-1	93
			Benzene, 1-methyl-2-propyl-	14677	001074-17-5	90
			Benzene, 1-methyl-4-propyl-	14681	001074-55-1	90