



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS  
(FUNGICIDA BENOMILO) POR MEDIO DE CONSORCIOS  
BACTERIANOS

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADA EN BIÓLOGIA

PRESENTA:  
AMINADAB GOMEZ MOLINA

DIRECTOR : Dr. JESÚS MUÑOZ ROJAS



MARZO 2021

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas-ICUAP, contando con los apoyos: 100425788-VIEP2019, 100425788-VIEP2018.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres Dulce Ma. Molina y Jorge Luis Gomez, primero por darme la vida, cuidarme por todo el apoyo dado durante mi vida.

A mis hermanos Jorge y Uriel por los momentos de risas y las veces que han sido mis cómplices en la vida.

A Erika Molina y Hugo Méndez, por quererme, escucharme y apoyarme en diversos momentos de mi vida, así como alentarme cuando sentía darme por vencida.

A mi tutor DR. Jesús Muñoz Rojas por aceptarme en este trabajo, el apoyo asesoramiento y atención brindada para su realización.

A mis mejores amigos Diana Rojas y Sergio Solís, por todos estos años de amistad, abrirme las puertas de sus respectivas casas y sobre todo por dejarme compartir momentos inolvidables con ustedes.

A Dr. Osvaldo Rodríguez Andrade, por la paciencia para explicarme temas relacionados a este trabajo, apoyarme en el desarrollo del mismo y sobre todo por brindarme tú amistad.

A Dra. Catherine Cesa Luna, por ayudarme en la realización de los experimentos de esta tesis.

A mis amigos Ana, Alday, Edith, Daniel, Jessica, Iván, Luz del Carmen, por el cariño, risas y momentos que compartimos en clases.

A mis compañeros del laboratorio Dra. América, Dra. Abisai, Mc Lester, Ariana, Citlali, Daniel, Erick, Fernanda, Francisco, Maritza, por los consejos, risas, pláticas y comidas que compartimos durante mi estadía en el laboratorio.

Y por último, pero no menos importante, a todos los docentes que formaron parte de mi formación académica, gracias.

## ÍNDICE.

|   |    |
|---|----|
| 1. Resumen.....   | 6  |
| 2. Introducción.....  | 7  |
| 2.1. Biorremedación.....  | 7  |
| 2.2. Fitorremedación.....   | 8  |
| 2.3. Biorremedación microbiana.....   | 8  |
| 2.4. Rizorremedación.....   | 9  |
| 2.5. Bacterias PGPR con capacidad de degradar compuestos xenobioticos.....      | 10 |
| 2.6. Biorremediación en México.....   | 12 |
| 3. Antecedentes.....  | 15 |
| 4. Justificación.....   | 17 |
| 5. Hipótesis.....   | 17 |
| 6. Objetivo general.....  | 18 |
| 6.1. Objetivos particulares.....  | 18 |
| 7. Material y Métodos.....  | 19 |
| 7.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo.....                                 | 19 |
| 7.2. Búsqueda de medios de selección.....                                       | 19 |
| 7.2.1. Pruebas de antibiogramas.....  | 19 |
| 7.2.2. Ensayos de crecimiento en placas con antibióticos..                      | 19 |
| 7.3. Experimento de antagonismo bacteria – bacteria.....                        | 22 |
| 7.3.1. Experimentos de inhibición simultánea.....                               | 22 |
| 7.3.2. Experimentos de doble capa bacteria – bacteria.....                      | 22 |
| 7.4 .Experimentos de doble capa bacteria – hongo.....                           | 24 |
| 7.5. Experimento de degradación de benomilo usando un consorcio bacteriano..... | 25 |

|   |    |
|---|----|
| 7.6. Curva de crecimiento en medio mínimo con benomilo como única fuente de carbono.....  | 25 |
| 7.7. Cuantificación de benomilo por HPLC.....   | 26 |
| 8. Resultados.....  | 28 |
| 8.1 Medios de selección.....  | 28 |
| 8.1.1. Antibiogramas.....   | 28 |
| 8.1.2. Ensayos de crecimiento en placas con antibióticos.....   | 30 |
| 8.2. Antagonismo. ....  | 34 |
| 8.2.1. Inhibición simultanea bacteria – bacteria.....   | 34 |
| 8.2.2. Inhibición por doble capa bacteria - bacteria.....   | 35 |
| 8.2.3. Inhibición por doble capa bacteria – hongo.....  | 35 |
| 8.3. Curvas de crecimiento y turbidez con benomilo.....   | 36 |
| 8.4. Crecimiento del hongo <i>Rhizopus</i> en medios con benomilo en donde se crecieron previamente cepas bacterianas.....  | 40 |
| 8.5. Crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 <sup>T</sup> en medios con benomilo, en donde se crecieron previamente las cepas bacterianas con potencial de biodegradación..... | 41 |
| 8.6. Cuantificación de benomilo por HPLC a partir de extractos de medios inoculados con bacterias.....  | 42 |
| 9. Discusión.....   | 46 |
| 10. Conclusiones.....   | 49 |
| 11. Perspectivas.....   | 50 |
| 12. Bibliografía.....   | 51 |

## 1. RESUMEN

Existe una gran diversidad de bacterias en el planeta, muchas de ellas son benéficas, desde diversas perspectivas, como agrobiotecnológica, médica y la biorremedación. Esta última rama ha tenido un interés especial en últimas fechas, debido al incremento de contaminantes en el ambiente. Uno de los sistemas más afectados han sido los suelos, ya que en ellos se vierten diversos tipos de agentes químicos en diversas formas (Herbicidas, fungicidas, etc.). Estos agentes químicos son los responsables de diversos cambios en el suelo, ocasionando desde la pérdida de microbiota y microfauna, hasta la pérdida de funciones del suelo, lo cual es una consecuencia grave.

Es por ello que en el presente trabajo se exploró la capacidad de degradación de un fungicida xenobiótico denominado benomilo, por medio de un consorcio bacteriano a nivel laboratorio, con cepas bacterianas conocidas por tener una resistencia al fungicida benomilo: *Pseudomonas putida* KT2440, *Burkholderia unamae* MTI-641, *Sphingomonas* sp. OF178 y *Enterobacter* sp. UAPS03001, así como el consorcio formado por las cuatro cepas.

Los resultados de este trabajo mostraron que las cuatro cepas pueden coexistir como un consorcio, ya que no se antagonizan entre sí. *P. putida* KT2440 fue la cepa que disminuyó con mayor eficacia la concentración de benomilo en un medio líquido con este compuesto como única fuente de carbono, cuando es crecida de manera individual. Por otra parte, con el consorcio bacteriano se logró disminuir la concentración de benomilo en mayor proporción que las cepas individuales bajo las mismas condiciones. También se observó que *B. unamae* MTI-641 y *E. sp.* UAPS03001 favorecen el crecimiento de un hongo sensible a benomilo, cuando este es inoculado en un medio gelificado en donde crecieron previamente las cepas bacterianas, por lo que se sugiere que podrían estar degradando el fungicida.

Este estudio contribuirá al desarrollo de un sistema para la degradación del benomilo en los terrenos de cultivo, ya que es uno de los fungicidas más utilizados en la agricultura de México y está reportado que tiene efectos tóxicos sobre diferentes organismos, incluido el ser humano.

## 2. INTRODUCCIÓN

El incremento de suelos altamente contaminados con distintos tipos de xenobióticos como fertilizantes, herbicidas, fungicidas, entre otros, implica un grave riesgo medioambiental y sanitario para la gran mayoría de países en vías de desarrollo. La descontaminación mediante técnicas convencionales físico-químicas, tales como la incineración, lavado, solidificación, o el enterramiento en vertederos especiales, representan un gasto monetario aproximadamente de 25 a 50 mil millones de USD por año a nivel mundial (El-Amier, Alghanem, & Alzuaibr, 2017); además, las técnicas convencionales no siempre bastan para obtener una descontaminación suficiente o total; generalmente se consideran como una primera acción para sitios muy contaminados. Por lo tanto, no son muy adecuadas para remediar grandes áreas, donde los contaminantes se encuentran dispersos en concentraciones bajas a moderadas (Peralta-Perez & Volke-Sepulveda, 2012). Es por ello que la biotecnología ha optado por nuevas técnicas más baratas y con mayor facilidad de lograr la descontaminación, con el fin de disminuir los costos, evitar otros tipos de contaminación (acuática, aérea, etc.) y que afecte lo menos posible a los microambientes que se encuentran alojados en las diferentes capas del suelo. Entre estas técnicas se encuentra la biorremediación.

### 2.1. Biorremediación

La biorremediación es el proceso de descontaminación que permite potenciar la degradación de un compuesto, aprovechando a través de diferentes procesos y técnicas, las capacidades de distintos organismos para acumular, transformar y degradar compuestos químicos biodisponibles para evitar posibles daños a los seres humanos o al medio ambiente (Miranda Martínez, Delgadillo Martínez, & Alarcón, 2007). A través de este proceso, los desechos orgánicos se degradan biológicamente bajo condiciones controladas, permitiendo la transformación o degradación de contaminantes en químicos no peligrosos o menos peligrosos, a un estado inocuo o niveles por debajo de los límites de concentración establecidos por autoridades (Vidali, 2001). La biorremediación se puede llevar a cabo *in situ* o *ex situ*. (Suarez Beltran, 2013). La biorremediación *in situ* es aquella que se realiza en el sitio contaminado, es decir no se extrae suelo contaminado, se realiza en el

lugar. La biorremediación *ex situ* es aquella en donde se extrae suelo contaminado, se transporta en contenedores especiales y se lleva a cabo el proceso de descontaminación, la cual es parcial, pues una vez que ha sido contaminado o dañado un ecosistema, no se puede volver a su estado original; inclusive, de forma natural es un proceso que tarda años en llevarse a cabo (Mendo Pascual, 2014). La biorremediación puede considerar el uso de organismos como plantas (fitorremediación) y microorganismos (biorremediación microbiana) (Tirado Torres, et al., 2015)

## **2.2. Fitorremediación**

La fitorremediación, tiene como objetivo degradar, asimilar, metabolizar o desintoxicar metales pesados, compuestos orgánicos y compuestos radioactivos por medio de plantas con capacidad fisiológica y bioquímica para absorber, retener, degradar o transformar sustancias contaminantes a formas menos tóxicas (López Martínez, et al., 2005). Para ello, utiliza plantas vasculares que pueden ser no nativas, o bien otros organismos como algas (fitorremediación). Estas técnicas han demostrado una gran efectividad, pero aún tienen algunas limitantes como la profundidad de las raíces y su capacidad de penetración en los suelos y la disponibilidad de agua (López Núñez, et al., 2004).

## **2.3. Biorremediación microbiana**

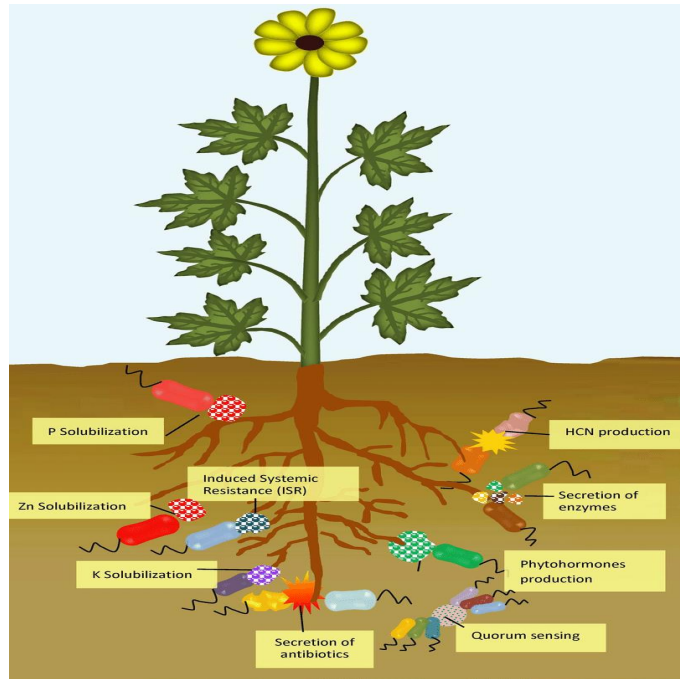
La biorremediación microbiana consiste en la utilización de microorganismos (bacterias, hongos, algas y protozoos) que tienen la capacidad de transformar diferentes compuestos tóxicos en otros de menor impacto ambiental (Rojas González, 2011), es decir, se busca simplificar un compuesto en sus elementos químicos más básicos (Rodríguez Conde, 2011). Este proceso puede ser de dos formas distintas: por medio “bioatenuación” (también llamada atenuación natural), la cual se lleva a cabo por los microorganismos autóctonos, principalmente bacterias del medio afectado y la “bioestimulación”, que consiste en la complementación del medio en el cual se encuentran los microorganismos, con nutrientes o condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos (nitratos, fosfatos, oxígeno o ajustes de pH (Rojas González, 2011). La biorremediación microbiana se lleva a cabo gracias a enzimas que son producidas



por los microorganismos (Dangond Araujo & Guerrero Dallos, 2006). Los microorganismos requieren de ciertas condiciones para metabolizar los sustratos, como humedad, oxígeno, pH y temperatura adecuados (Paisio C., González P., Talano A., 2012).

#### **2.4. Rizorremediación**

Muchas especies bacterianas tienen la capacidad de asociarse con plantas a nivel de la rizósfera, que es la zona del suelo influenciada por los exudados de la raíz de la planta (Chiocchio, 2000; Kent & Triplett, 2002). Esta zona estrecha del suelo que rodea a la raíz de las plantas, puede estar ocupada por bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR, por sus siglas en inglés) (Beneduzi, Ambrosini, & Passaglia, 2012). Como resultado de esta asociación simbiótica, las bacterias pueden beneficiarse al utilizar algunos compuestos de los exudados de la raíz de la planta como nutrientes, mientras que las bacterias pueden estimular el crecimiento de la planta a través de mecanismos directos o indirectos (Olanrewaju, Glick, & Babalola, 2017). Entre los principales mecanismos que influyen de manera directa el crecimiento de las plantas, se encuentran la fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos y producción de fitohormonas (Molina Romero et al., 2015; Rodríguez Andrade et al., 2018) De manera indirecta, la planta puede verse beneficiada por la capacidad de algunas bacterias para producir sustancias antimicrobianas (Figura 1), por ejemplo sideróforos, inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos para la planta, o bien, desencadenando la respuesta de la planta frente a patógenos (Martinez Canchignia, et al., 2015). Algunos géneros con bacterias PGPR son: *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconoacetobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* (Bashan, et al., 2012).



**Figura 1. Mecanismos de acción de las PGPR** (Mishra, Prakash, & Arora, 2017)

Cuando un microorganismo tiene la capacidad de degradar compuestos xenobióticos y se encuentra estimulado por los exudados radiculares de la planta, se denomina a este proceso como “rizorremediación” (Gerhardt, et al., 2009; Meagher, 2000; Tripathi, 2007), el cual depende de múltiples factores, entre ellos el tipo de planta sembrada, la biodisponibilidad del compuesto tóxico, y de la interacción entre plantas y microorganismos (Paisio C., et al., 2012).

## **2.5. Bacterias PGPR con capacidad de degradar compuestos xenobióticos.**

Las bacterias desempeñan una función muy importante en los ciclos de biodegradación, ya que en estudios recientes se ha demostrado que varias especies tienen la capacidad de metabolizar diferentes tipos de contaminantes (aromáticos, benzimidazoles, carbamados, cíclico-organoclorados, compuestos cúpricos, halogenados, hidrocarburos, etc.). En diferentes tipos de microambientes y bajo determinadas condiciones, estas capacidades de degradación, las han hecho candidatas para ser empleadas como una herramienta en las técnicas de biorremediación. El fundamento de estas técnicas está basado en que muchos de los compuestos xenobióticos son de naturaleza lipofílica, cadenas alquílicas, anillos aromáticos y algunos halógenos (Martínez Cortazar et al., 2012). En la estrategia de remediación, se pueden utilizar diferentes técnicas por separado o

en combinación para lograr una mayor eficiencia de remoción del contaminante, principalmente se busca la destrucción y modificación del compuesto xenobiótico. En este tipo de tecnologías se busca alterar la estructura química del contaminante, para que este sea menos dañino al medio ambiente. Existen bacterias capaces de metabolizar diversos tipos de compuestos xenobioticos y algunas de ellas son de importancia agrobiotecnológica (Rodríguez-Andrade O., 2009). Algunos ejemplos son los siguientes:

- *Pseudomonas putida* KT2440, que es una bacteria Gram-negativa, saprófita, con capacidad para promover el crecimiento de plantas a través de la solubilización de fosfatos y producción de sideróforos (Pincay Verdezoto, 2014), no es patógena y es considerada un hospedero seguro para la clonación de genes (Jimenez, Miñambres, García, & Díaz, 2002); es considerada apta para procesos de biorremedación de compuestos xenobióticos, ya que tiene la capacidad de degradar n-alcanos y metilnaftalenos por oxidación con una hidroxilasa (Alanís & Guerrero, 2004).

- *Burkholderia unamae* es una bacteria Gram-negativa, fijadora de nitrógeno aislada de la rizosfera de maíz; esta bacteria es capaz de utilizar compuestos aromáticos como fuente de carbono y produce sideróforos (Caballero Mellado, et al., 2004). Estas características la hacen una candidata para utilizarse en técnicas de biorremediación y como agente de biocontrol (Gordillo Delgadillo, et al., 2016).

- Dentro de la familia Enterobacteriaceae, se han reportado especies PGPR, las cuales tienen un papel potencial en el desarrollo de sistemas sostenibles de cultivo (Bertona et al., 2005). Algunas bacterias del género *Enterobacter* han demostrado tener la capacidad de fijar nitrógeno, son Gram-negativas, ubicuas, encontrándose de forma universal en agua, suelo y en la vegetación (Puerta García & Mateos Rodríguez, 2010). Algunas bacterias pueden tener capacidad metabólica para transformar los hidrocarburos y convertir sus moléculas con características de peligrosidad en componentes que pueden ser reincorporados a los ciclos biogeoquímicos naturales (Arrieta Ramírez et al., 2012). Se tienen registros de cepas aisladas de la rizósfera de pasto, sorgo, trigo y maíz, además de ser capaces de producir ácido indolacético, que es una fitohormona (Mehnaz et al., 2001).

- El género *Sphingomonas* también ha sido considerado dentro de las PGPR, ya que diferentes cepas han sido aisladas de fuentes naturales, como suelo volcánico y la rizósfera (Feng et al., 2014). Se ha demostrado que algunas bacterias de este género pueden degradar compuestos aromáticos, como el naftaleno, (Fredrickson et al., 1999), siendo considerada para tratamientos de rizadorremediación.

## **2.6. Biorremediación en México.**

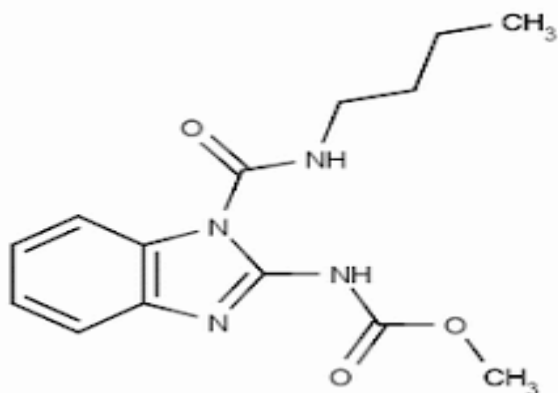
En México, el desarrollo de una de las actividades económicas más grandes e importantes es la agricultura. A través del tiempo se han creado diferentes tipos de componentes para evitar el crecimiento de especies invasoras que afecten los cultivos agrícolas que merman la capacidad de producción, afectando la economía de los productores agrícolas. Ante estos problemas, se han ido utilizando compuestos xenobióticos cada vez más tóxicos, con el propósito de erradicar especies denominadas como plagas. Sin embargo, también se ha demostrado que el uso indiscriminado de éstos, causa serias afectaciones a diversas interacciones químico-biológicas que se llevan a cabo en el suelo; estos agentes químicos sintéticos que pueden estar presentes en el ambiente, pero que no son de origen natural, generalmente ocasionan algún efecto negativo en diferentes tipos de organismos (animales, hongos, insectos, microbiota, plantas) (Barranco Cuellar, 2016).

La mayoría de los xenobióticos poseen una alta resistencia a las transformaciones químicas y bioquímicas y persisten en el medio ambiente, ya que poseen una larga vida media en la biota, suelo, sedimentos y agua, incluso en algunos productos alimenticios (semillas, frutos etc.). Esto puede ocasionar su bioacumulación dentro de la cadena trófica y en algunos casos causa la biotransformación del compuesto, la cual estará mediada por agentes biológicos y por su biodisponibilidad en el ambiente.

Un ejemplo de estos xenobióticos que es ampliamente utilizado en la agricultura de México para el control y prevención de hongos en cultivos es el fungicida benomilo o Metil-1-(butilcarbamoil)-2-bencimidazol-carbamato ( $C_{14}H_{18}N_4O_3$ ) (Figura 2) (Izquierdo - Romero, 2013)(Alonso et al., 2003). El benomilo es un fungicida sistémico, sólido, cristalino, blanco, cuyo ingrediente activo son los

benzimidazoles; este compuesto de absorción radical y foliar es ampliamente usado en cultivos de leguminosas y árboles frutales como: aguacate, arroz, cacahuate, calabaza, fresa, frijol, jitomate, lechuga, limonero, mango, maíz, naranja, plátano etc. y actúa principalmente afectando la fisiología reproductiva de los hongos, dañando la formación de esporas o el proceso germinativo (Verdú, 1971). Su uso excesivo en pre cosecha puede generar el desarrollo de cepas del hongo resistentes a benomilo (Sangchote S, 1989). El benomilo puede entrar en los tejidos vasculares de la planta y ser transportado por medio de la savia a las diferentes estructuras de la planta, inhibiendo la biosíntesis de ergosterol (Dangond Araujo & Guerrero Dallos, 2006).

Por sus características químicas tiene la facilidad de ser persistente en el ambiente y también puede fijarse en el suelo, la superficie de las frutas y hortalizas (Ibarz, et al., 2015b).



**Fig.2. Formula química estructural del benomilo** (Verdú, 1971).

Se han realizado estudios sobre sus efectos en la microbiota edáfica, donde el benomilo no tuvo efecto en las poblaciones bacterianas del suelo en estudios de laboratorio (Siegel, 1975), bajo condiciones de invernadero (Kaastra-Howeler & Gams, 1973) o condiciones de campo (Peeples JL, 1974). También se ha demostrado que el benomilo es una molécula tóxica para peces, ratas y seres humanos (Pazos rojas et al., 2016). Dentro de los animales su metabolización es rápida y la secreción es por medio de la orina. Se tienen registros sobre incidencia de adenomas y carcinomas hepáticos en ratas, así como malformaciones craneoencefálicas en los fetos de ratas wistar; el único efecto genotóxico

consistente observado en estudios con animales es la inducción de aberraciones cromosómicas numéricas; además es considerado un posible cancerígeno en personas. Se ha reportado que el carbendazim, un metabolito producto de la degradación parcial del benomilo, es altamente tóxico para mamíferos y lombrices de tierra y medianamente tóxico para peces, crustáceos, abejas y algas (Jonhson, 1980)

La degradación del benomilo se ha hecho por métodos fotoquímicos y radiación UV (Ibarz, et al., 2015a). Al descomponerse el benomilo por medio de una hidrólisis, sufre una transformación química y pasa a ser carbendazim (metilbenzimidazol-2-il carbamato, formula  $C_9H_9N_3O_2$ ) que es una molécula más tóxica que el benomilo, también es usada como un fungicida, ya que interviene en la división celular mitótica del hongo (Barranco Cuellar, 2016).

### 3. ANTECEDENTES

El uso indiscriminado de xenobióticos en diversas áreas de la vida cotidiana, ha ido afectando de forma paulatina el desarrollo de diversas especies vegetales de importancia alimenticia; a partir de ésto, se han implementado una serie de estrategias para poder extraer estos compuestos del medio, para evitar su bioacumulación, biomagnificación y biotransformación y que afecten un área importante, donde cohabitan diversas especies de microfauna y microbiota.

Los géneros bacterianos más estudiados por su capacidad de degradación son *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, ya que se ha reportado que contienen diversos mecanismos para degradar compuestos aromáticos y son colonizadoras de raíces de plantas (Seo, et al., 2009). En algunos casos, la inoculación de un solo microorganismo no resultó efectiva en la actividad degradadora, debido a que algunos factores como la baja disponibilidad del compuesto xenobiótico, la microbiota nativa, pueden afectar la actividad del inóculo. (Coppotelli, et al., 2008). Se ha demostrado que *Pseudomonas aeruginosa* y algunas bacterias del género *Enterobacter* son capaces de degradar compuestos organofosforados, encontrados en diversos pesticidas utilizados en cultivos de interés agroalimenticio (Colorado, et al., 2016).

Un ejemplo común de degradación bacteriana en el suelo es el que ocurren en los herbicidas IMI y TPS, llamados así por sus principales componentes (Imidazoles y Triazolpirimidinas). Estos se adhieren a la materia orgánica y las bacterias edáficas se encargan de la degradación de estos compuestos (Barranco Cuellar, 2016; Rodríguez, 2005).

Recientemente se ha reportado que los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* y *Sphingomonas*, crecen de manera constante en presencia del fungicida benomilo y que este mismo puede ser utilizado como única fuente de carbono (Barranco Cuellar, 2016).

El cultivo de consorcios bacterianos es una técnica que se utiliza para estudiar la interacción y los mecanismos que tienen los microorganismos para establecerse y mantenerse en los distintos ambientes. (Madueño, Coppotelli, & Morelli, 2009) reportaron que el uso de consorcios bacterianos ha sido eficaz en la degradación de xenobióticos aromáticos. El consorcio formado por *Achromobacter* sp. BAB239, *Pseudomonas* sp. DV-AL2, *Enterobacter* sp. BAB240 y *Pseudomonas* sp. BAB241, aislado de sedimentos de un puerto en Gujarat, India, degrada naftaleno en presencia de otros hidrocarburos y puede utilizar otros hidrocarburos como fuente de carbono (Tirado Torres et al., 2015). Los géneros bacterianos más usados para consorcios con capacidad de degradar componentes xenobióticos son: *Variovax*, *Flavimonas*, *Stenotrophomonas*, *Cupriavidus*, *Sphingomonas*, *Bosea*, *Bordetella*, *Thermomonas*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Parvibaculum* y *Sphingobium* (Paixão et al., 2010).



#### **4. JUSTIFICACIÓN**

El uso indiscriminado de diversos compuestos xenobioticos (fungicidas, herbicidas, plaguicidas, etc.) en la agricultura mexicana, ha ocasionado una contaminación no solo terrestre, si también acuática, alimenticia e incluso aérea. Los efectos nocivos de estos compuestos para las plantas, animales e incluso el ser humano no han sido suficientemente investigados para dejar de usarse en México. Algunos países de la Unión Europea han prohibido el uso del fungicida benomilo por su efecto teratógeno y posiblemente cancerígeno. Se ha tratado de disminuir su toxicidad, aunque esto no ha sido posible, ya que un metabolito secundario producto de su degradación resulta aún más tóxico. Es por ello que en el presente trabajo se evaluó la capacidad de varias especies de bacterias PGPR para degradar el fungicida benomilo, de manera individual y en consorcio, con la finalidad de desarrollar un futuro sistema de rizorremediación para este compuesto.

#### **5. HIPÓTESIS**

El consorcio bacteriano formado por bacterias benéficas (*B. unamae*, MTI-641, *E. sp.* UAPS03001, *P. putida* KT2440 y *S. sp.* OF-178) tendrá la capacidad de degradar el fungicida benomilo más eficientemente que las cepas individuales, en condiciones de laboratorio.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la capacidad de bacterias benéficas para degradar el compuesto xenobiótico benomilo.

### **6.1. Objetivos particulares**

- 1.-Determinar medios de selección para las bacterias usadas en consorcio.
- 2.-Evaluar la capacidad de cuatro cepas para coexistir en consorcio (*Pseudomonas putida* KT2440, *Burkholderia unname* MTI-641, *Enterobacter* sp. UAPS03001, *Sphingomonas* sp. OF-178).
- 3.-Evaluar la resistencia de bacterias PGPR al fungicida benomilo, de manera individual y en consorcio.
- 4.-Determinar la capacidad de bacterias PGPR para degradar el fungicida benomilo.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las cepas bacterianas que fueron utilizadas en este trabajo se muestran en la tabla 1. **Tabla 1. Cepas bacterianas y medios de cultivo**

| Cepa bacteriana                    | Medio de cultivo | Propósito                                  |
|------------------------------------|------------------|--|
| <i>Burkholderia unamae</i> MTI-641 | BAC              | Crecimiento y selección de cepa bacteriana |
| <i>Enterobacter</i> sp. UAPS03001  | Rojo Congo       |  |
| <i>Pseudomonas putida</i> KT2440   | LB               |  |
| <i>Sphingomonas</i> sp. OF-178     | LB 5%            |  |

### 7.2. Búsqueda de medios de selección

#### 7.2.1. Pruebas de antibiogramas

Para conocer la sensibilidad de las bacterias utilizadas en este trabajo a distintos antibióticos, se sembró una muestra del cultivo de cada una de las cepas en un medio gelificado, basándose en el principio de difusión del antibiótico en el agar. El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se inocularon cada una de las cepas (*B. unamae* MTI-641, *E. sp.* UAPS03001, *P. putida* KT2440 y *S. sp.* OF-178) en 10 mL de medio LB y se incubaron en agitación constante (150 r.p.m.) durante 24 h.
2. A partir de cada cultivo, se inoculó 1 mL en placas con medio LB, en las cuales se realizó un estriado masivo con un asa microbiológica estéril, asegurando que la bacteria fue extendida en toda la superficie de la placa.
3. Una vez que el exceso de humedad fue eliminado de la superficie de las placas, se tomó un multidisco (estuche de Multidiscos combinados BIO-RAD, CAT 71080380) con unas pinzas estériles y se colocó en la superficie

de la placa. Los antibióticos contenidos en los multidiscos se muestran en la tabla 2.

4. Las placas con los multidiscos fueron incubadas por 24 h a 30 °C.

Después de la incubación, se realizó la medición del diámetro de los halos de inhibición alrededor de los discos que contienen los diferentes antibióticos, utilizando un vernier con escala en milímetros. Para conocer la susceptibilidad de las cepas a cada uno de los antibióticos, los datos fueron comparados con la tabla de referencia proporcionada por el fabricante de los multidiscos.

| <b>Tabla 2: Descripción del contenido del multidisco utilizado</b> |                    |                            |
|--|--------------------|----------------------------|
| <b>Nombre del Antibiótico</b>                                      | <b>Abreviatura</b> | <b>Contenido del disco</b> |
| <b>Amikacina</b>   | AK                 | 30 µg                      |
| <b>Ampicilina</b>  | AM                 | 10 µg                      |
| <b>Levofloxacina</b>   | LEV                | 5 µg                       |
| <b>Cefalotina</b>  | CF                 | 30 µg                      |
| <b>Cefotaxima</b>  | CTX                | 30 µg                      |
| <b>Ceftriaxona</b>   | CRO                | 30 µg                      |
| <b>Cloranfenicol</b>   | CL                 | 30 µg                      |
| <b>Gentamicina</b>   | GE                 | 10 µg                      |
| <b>Netilmicina</b>   | NET                | 30 µg                      |
| <b>Nitrofurantoína</b>   | NF                 | 300 µg                     |
| <b>Cefepime</b>  | FEP                | 30 µg                      |
| <b>Trimetoprim-Sulfametoxazol</b>                                  | SXT                | 25 µg                      |

### **7.2.2. Ensayos de crecimiento en placas adicionadas con antibióticos.**

Una vez que se determinó la resistencia de las 4 cepas bacterianas a los antibióticos contenidos en los multidiscos, se eligieron los antibióticos en los que las bacterias mostraron una mayor sensibilidad, para llevar a cabo la evaluación de la resistencia en medio de cultivo gelificado, adicionado con estos antibióticos. Para ello, se hizo lo siguiente:

1. Las cuatro cepas bacterianas fueron inoculadas en 10 mL de medio LB y se incubaron durante 24 h a 30 °C en agitación constante (150 r.p.m.)
2. Se prepararon placas con los siguientes medios y antibióticos: BAc, LB, LB al 5% y Rojo Congo. (tabla 3).

3. En una placa multipozos se colocaron 3 muestras de 120  $\mu$ l de cada una de las cepas bacterianas. En el resto de los pozos de la placa, se depositaron 180  $\mu$ L de agua destilada estéril, lo cual permitió realizar diluciones seriadas 1:10. Para ello, se realizó una transferencia de 20  $\mu$ L de suspensión bacteriana de una fila de pozos a la siguiente y se resuspendió la solución utilizando de una micropipeta multicanal. Este proceso se repitió consecutivamente hasta la última fila de pozos de la placa. Es importante mencionar que se realizó un cambio de puntas de la micropipeta para cada una de las diluciones consecutivas.
4. Por medio de un replicador estéril, se realizó un sellado de las diluciones en los diferentes medios de cultivo adicionado con antibióticos (Corral Lugo et al., 2012). El volumen de suspensión bacteriana depositado por cada prolongación del replicador sobre la superficie de las placas fue de aproximadamente 1.65  $\mu$ L (DS=0.26).
5. Una vez que se evaporó el exceso de líquido sobre la superficie del medio, las placas se incubaron durante 24 h a 30°C. Para el caso de *E. UAPS03001* la incubación se prolongó 24 h más.
6. A partir del crecimiento bacteriano en las placas con los medios de cultivo adicionados con antibióticos, se llevó a cabo la cuantificación de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), determinándose el medio de cultivo y la concentración de antibiótico en la que cada cepa es sensible.

**Tabla 3: Medios de cultivo gelificados adicionados con antibióticos.**

| <b>BAc</b>            |                   | <b>LB</b>                        | <b>LB 5%</b>       | <b>R.C</b>       |                   |                |                  |
|-----------------------|-------------------|----------------------------------|--------------------|------------------|-------------------|----------------|------------------|
| <b>Amikacina (AK)</b> | Ceftriaxona (CRO) | Trimetoprim-Sulfametoxazol (STX) | Cloranfenicol (CM) | Gentamicina (GM) | Ceftriaxona (CRO) | Amikacina (AK) | Gentamicina (GM) |
| <b>20 mg/mL</b>       | 20 mg/mL          | 20 mg/mL                         | 100 mg/mL          | 20 mg/mL         | 20 mg/mL          | 20 mg/mL       | 20 mg/mL         |
| <b>30 mg/mL</b>       | 30 mg/mL          | 30 mg/mL                         | 150 mg/mL          | 30 mg/mL         | 30 mg/mL          | 30 mg/mL       | 30 mg/mL         |
| <b>50 mg/mL</b>       | 50 mg/mL          | 50 mg/mL                         | 200 mg/mL          | 50 mg/mL         | 50 mg/mL          | 50 mg/mL       | 50 mg/mL         |
| <b>80 mg/mL</b>       | 80 mg/mL          | 80 mg/mL                         |                    | 80 mg/mL         | 80 mg/mL          | 80 mg/mL       | 80 mg/mL         |

### **7.3. Experimentos de antagonismo bacteria-bacteria**

Se ha reportado que las bacterias producen al menos una sustancia que inhibe el crecimiento de otras (Pérez y Terrón, Gonzalez Montfort, & Muñoz Rojas, 2014). Con la finalidad de formar un consorcio bacteriano en el que las cepas bacterianas no inhiban el crecimiento de otra, se realizaron 2 tipos de experimentos: experimentos de inhibición simultánea y experimentos de doble capa.

#### **7.3.1. Experimentos de inhibición simultánea**

Diversas bacterias pueden coexistir en un mismo medio, utilizando los diversos recursos que están a su alrededor, pero pueden producir una sustancia que logre inhibir el crecimiento simultáneo de otra para así poder aprovechar al máximo y reducir la competencia por los recursos biodisponibles. En los experimentos de inhibición simultánea se realizó lo siguiente:

1. Se preparó un pre-inoculo de las cuatro cepas bacterianas en medio LB líquido, el cual se incubó durante 24 h a 30°C en agitación continua (150 r.p.m.).
2. En el centro de una placa de medio LB se colocó una gota de 50  $\mu$ L de la cepa considerada como posible “productora” de la sustancia inhibitoria. Una vez que se eliminó el exceso de humedad sobre la superficie de la placa, se colocó 1 mL de la cepa considerada como posible “sensible” y se realizó un sembrado masivo. Las placas fueron incubadas durante 24 h a 30°C.
3. Después de la incubación, se determinó si existe una inhibición del crecimiento de la cepa “sensible” alrededor de la zona en donde se inoculó la cepa “productora”, a través de la observación de un halo sin crecimiento bacteriano. En las placas donde no se presentó inhibición, se observó un crecimiento masivo de la cepa “sensible”.

#### **7.3.2. Experimento de doble capa bacteria-bacteria.**

Este método se basa en el principio de que las bacterias pueden producir alguna sustancia que permanece en el medio después de que éstas han sido retiradas e inhiben el crecimiento de otra bacteria.

## Primera capa

1. Se partió de un inóculo de 5 mL de las cuatro cepas bacterianas en tubos con 10 mL de medio LB líquido, los cuales fueron incubados en agitación constante (150 r.p.m.) durante 24 h a 30 °C, considerándose a estas cepas como posibles “productoras” de sustancia inhibitoria.
2. Se colocó una gota de 20 µL de cada cultivo bacteriano en placas de LB, se dejaron secar y se incubaron durante 24 h a 30 °C.
3. Después de la incubación, el crecimiento bacteriano fue retirado con portaobjetos e hisopos estériles.
4. Las placas fueron sometidas a vapores de cloroformo durante 90 minutos, con la finalidad de asegurar que no haya bacterias vivas en la placa donde fue retirado el crecimiento bacteriano. Para ello, se invirtieron las placas y se colocaron 10 mL de cloroformo sobre papel absorbente en las tapas de las placas; este proceso se llevó a cabo en una campana de extracción de gases. Los residuos de cloroformo se eliminaron, dejando abierta la placa durante 90 minutos en una campana de flujo laminar.

## Segunda capa

1. Se prepararon cultivos en 5 mL de medio LB de las cuatro cepas bacterianas, considerándolas como posibles “sensibles” frente a la sustancia inhibitoria.
2. Se tomaron 1.5 mL de cada cultivo bacteriano y se inocularon en tubos con 4 mL de medio LB semigelificado (7.5 gramos de agar por litro de medio de cultivo).
3. El medio semigelificado inoculado fue vertido sobre las placas que fueron sometidas a vapores de cloroformo y que contienen las posibles sustancias inhibitorias. Después, las placas se incubaron durante 24 h a 30 °C y se evaluó el crecimiento de la cepa sensible.

#### 7.4. Experimentos de doble capa bacteria-hongo

Una vez que se determinó que las cepas bacterianas no se inhiben entre sí, se realizaron experimentos para evaluar si existe antagonismo de las bacterias hacia el hongo que fue usado como indicador en este trabajo, ya que existen estudios sobre bacterias PGPR que son capaces de inhibir el crecimiento de algunos hongos patógenos para las plantas, por medio de la secreción de sustancias antimicrobianas (López, et al., 1991). Esto fue necesario porque en algunos ensayos se usó un hongo indicador (*Rhizopus*) sensible a benomilo, de tal forma que se requiere determinar si las 4 cepas bacterianas poseen la capacidad de degradar benomilo, para posteriormente observar la capacidad del hongo indicador para crecer en los medios donde fue degradado el benomilo. Por esta razón es importante demostrar que el hongo no es inhibido.

##### Primera capa

1. Se prepararon cultivos en 5 mL de medio líquido LB de las cuatro cepas bacterianas y se incubaron en agitación constante durante 24 h a 30 °C.
2. Se colocó una gota de 20 µL de cada uno de los cultivos en placas de LB sin NaCl, se dejaron secar y se incubaron durante 24 h a 30 °C.
3. Después de la incubación, el crecimiento bacteriano fue retirado con portaobjetos e hisopos estériles.

Las placas fueron sometidas a vapores de cloroformo durante 60 minutos, con la finalidad de asegurar que no haya bacterias vivas en la placa donde fue retirado el crecimiento bacteriano. Para ello, se invirtieron las placas y se colocaron 10 mL de cloroformo sobre papel absorbente en las tapas de las placas. Este proceso se llevó a cabo en una campana de extracción de gases. Los residuos de cloroformo se eliminaron dejando abierta la placa durante 60 min en una campana de flujo laminar.

##### Segunda capa

1. El hongo del género *Rhizopus* fue sembrado en placas de medio LB sin NaCl y se incubaron durante 48 h a 30°C.



2. Se tomó un trozo pequeño del medio gelificado donde se cultivó el hongo y se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril y después se agitó vigorosamente durante 5 minutos con la finalidad de desprender del medio la mayor cantidad de hifas. A partir de la suspensión, se colocó una gota de 50  $\mu$ L en la superficie de la placa, la cual fue sometida previamente a vapores de cloroformo y se resembró de forma masiva.
3. Las placas fueron incubadas durante 48 h a 30 °C y se evaluó el crecimiento del hongo en la placa.

### **7.5. Experimentos de degradación de benomilo, utilizando un consorcio bacteriano**

Para evaluar la capacidad para degradar benomilo de las 4 cepas bacterianas de manera individual y en consorcio, se utilizó a la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal 5<sup>T</sup> como indicador, ya que ha sido reportada previamente como sensible a este fungicida (Ríos, Yoania, Dibut, 2007). Para ello, se realizó el siguiente procedimiento:

1. Las 4 cepas bacterianas y el consorcio fueron inoculadas en 20 mL de medio SYP adicionado con benomilo a una concentración de 1 mg/mL y se incubaron durante 48 h a 150 r.p.m. 30 °C.
2. Los cultivos fueron centrifugados (140 r.p.m. durante 30 min) y el sobrenadante fue separado y esterilizado (1 atm por 15 min), con la finalidad de asegurar que no hubiera bacterias vivas en este.
3. A partir del sobrenadante estéril de cada cepa y el consorcio, se prepararon medios de cultivo gelificado, mezclando el sobrenadante con medio SyP, a una proporción 1:1.
4. *G. diazotrophicus* Pal 5<sup>T</sup> fue inoculada en 50 mL de medio LGI y se incubó durante 48 h a 3 °C en agitación constante (150 r.p.m.)
5. En las placas de medio SYP y en los medios selectivos se realizaron cuantificaciones de UFC/mL mediante goteo en placa.

### **7.6. Curva de crecimiento en medio mínimo con benomilo como única fuente de carbono**

Para evaluar el crecimiento o supervivencia de las 4 cepas bacterianas en presencia del fungicida benomilo (cepas individuales y en consorcio) se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1. Las 4 cepas bacterianas fueron inoculadas en 10 mL de medio LB y se incubaron durante 24 h en agitación constante (150 r.p.m.) a 30 °C.
2. A partir de estos cultivos se ajustó la densidad óptica inicial para cada uno de ellos (0.05 a 620 nm) y se colocó el volumen correspondiente en matraces con 50 mL de medio MM9 adicionado con 1 mg/mL de benomilo ,los cuales se incubaron durante 4 días en agitación constante (150 r.p.m.) a 30 °C.mm9 sin fuente de carbono .
3. Antes de iniciar la incubación, se midió la absorbancia (620 nm) y se cuantificó el número de UFC/mL de cada uno de los cultivos por el método de goteo en placa (Hoben & Somasegaran, 1982), utilizándose 3 réplicas para cada tratamiento.

En diferentes tiempos experimentales (0, 3, 6, 24, 27, 30, 48, 51, 54, 72, 75, 78 h), se tomaron 3 muestras de 1 mL de cada tratamiento, las cuales se usaron para medir la absorbancia y cuantificar el número de UFC/mL.

### **7.7. Cuantificación de benomilo por HPLC**

Para determinar la cantidad de benomilo que permanece en los cultivos después del crecimiento del consorcio y las cepas individuales, se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se prepararon 6 matraces con 30 mL de medio mínimo MM9 con 10 mg/mL de benomilo como única fuente de carbono y medio mínimo MM9 sin fuente de carbono
2. Se inocularon 5 matraces con las 4 cepas y el consorcio y se incubaron durante 96 h a 37 °C en agitación constante (150 r.p.m.). El matraz sin inocular fue usado como control.
3. Después de 96 h de incubación, los matraces se dejaron en reposo a temperatura ambiente, con poca luz, durante 96 h.
4. Posteriormente, se depositaron los 30 mL de la muestra en un embudo de separación de 1000 mL y se realizó un lavado con 10 mL de cloroformo.

Para esto, el embudo se agitó durante 5 min y se procedió a la liberación de gases, abriendo la llave del embudo durante el proceso.

5. El embudo fue mantenido en reposo durante 48 h, para permitir la separación de la solución en 3 fases: orgánica, inorgánica e intermedia (extracción líquido-líquido).
6. Una vez separadas, se drenó el contenido, cuidando que la fase intermedia no fuera drenada. Para ello, en un recipiente estéril se colocó papel filtro con sulfato de sodio ( $\text{NaSO}_4$ ) y se recuperó sólo la fase inorgánica por medio de decantación. 2.5 mL de esta fase fueron resguardados en tubos falcon de 10 mL.
7. Posteriormente, después de 15 días se colocaron 2 mL de cada muestra y un estándar de un stock de 2g/30mL en 4 diluciones para fijar los puntos de referencia del benomilo en viales.
8. Los ensayos de HPLC se realizaron utilizando un equipo "Waters 2707", en el que la columna se mantuvo en temperatura ambiente y se empleó una fase móvil compuesta por metanol y buffer de fosfato de amonio 50 mM, ajustado a un pH 6.8. Para la detección de benomilo se usó una fase móvil de acetonitrilo.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Medios de selección

#### 8.1.1. Antibiogramas

Después de someter a *P. putida* KT2440, *E. sp* UAPS03001, *B. uname* MTI-641 y *S. sp.* OF-178 a un test de antibiograma con 12 antibióticos diferentes, se observó que las cuatro cepas bacterianas presentaron una amplia resistencia a la mayoría de estos antibióticos. *P. putida* KT2440 presentó resistencia intermedia a GM, mientras que fue sensible a AK, LEV y NET (Tabla 4). *E. sp.* UAPS03001 fue la más resistente de las cuatro cepas frente a los antibióticos evaluados, pues solo presentó resistencia intermedia a CL y LEV, mientras que fue resistente al resto de los antibióticos (tabla 7). Por otro lado, *B. uname* MTI-641 presentó resistencia a 10 antibióticos (total o intermedia) y sensibilidad solo a CL y NET (Tabla 5). *S. sp.* OF168 y *E. sp.* UAPS03001, presentaron resistencia intermedia a CL y sensibilidad a STX y NET (Tabla 6).

**Tabla 4. Resultados del antibiograma de *P. putida* KT2440.**

| Abreviatura | Diámetro del halo | Resistente/sensible |
|-------------|-------------------|---------------------|
| AK          | 19 mm             | Sensible            |
| AM          | --                |                     |
| LEV         | 17 mm             | Sensible            |
| CF          | --                |                     |
| CTX         | --                |                     |
| CRO         | --                |                     |
| CL          | --                |                     |
| GE          | 14 mm             | Intermedio          |
| NET         | 19 mm             | Sensible            |
| NF          | —                 |                     |
| FEP         | —                 |                     |
| SXT         | —                 |                     |

**Tabla 5. Resultado del antibiograma de *B. uname* MTI-641.**

| Abreviatura | Diámetro del halo | Resistente/sensible |
|-------------|-------------------|---------------------|
| AK          | --                |                     |
| AM          | --                |                     |
| LEV         | 16 mm             | Intermedio          |
| CF          | --                |                     |
| CTX         | --                |                     |
| CRO         | --                |                     |
| CL          | 18 mm             | Sensible            |
| GE          | 13 mm             | Intermedio          |
| NET         | 18 mm             | Sensible            |
| NF          | --                |                     |
| FEP         | --                |                     |
| SXT         | --                |                     |

**Tabla 6. Resultado del antibiograma de *S. sp.* OF-178.**

| Abreviatura | Diámetro del halo | Resistente/sensible |
|-------------|-------------------|---------------------|
| AK          | 12 mm             | Resistente          |
| AM          | --                |                     |
| LEV         | 16 mm             | Intermedio          |
| CF          | --                |                     |
| CTX         | --                |                     |
| CRO         | --                |                     |
| CL          | 16 mm             | Intermedio          |
| GE          | --                |                     |
| NET         | 15 mm             | Sensible            |
| NF          | --                |                     |
| FEP         | --                |                     |
| SXT         | 18 mm             | Sensible            |

**Tabla 7. Resultado del antibiograma de *E. sp.* UAPS03001**

| Abreviatura | Diámetro del halo | Resistente/sensible |
|-------------|-------------------|---------------------|
| AK          | --                | Intermedio          |
| AM          | --                |                     |
| LEV         | 14 mm             |                     |
| CF          | --                | Resistente          |
| CTX         | --                | Intermedio          |
| CRO         | 11 mm             |                     |
| CL          | 15 mm             | Resistente          |
| GE          | --                |                     |
| NET         | 9 mm              |                     |
| NF          | --                | Resistente          |
| FEP         | --                |                     |
| SXT         | 10 mm             |                     |

### 8.1.2. Ensayos de crecimiento en placas con antibióticos

De acuerdo a los resultados de los ensayos de antibiogramas, se eligieron algunos antibióticos en los que alguna de las 4 cepas bacterianas mostró resistencia y las 3 restantes fueron sensibles o tuvieron resistencia intermedia, para evaluarlos cuando son adicionados en medios de cultivo gelificados. Para *B. unamae* MTI-641 se evaluaron 12 opciones (diferentes antibióticos y concentraciones), observándose que los 2 medios con mayor eficacia para permitir el crecimiento de esta cepa e inhibir a las demás fueron BAc STX<sup>80</sup> y BAc GM<sup>80</sup> (Tablas 8 y 9), ya que fueron los medios donde se logró el crecimiento más bajo de las cepas *S. sp.* OF-178 y *E. sp.* UAPS03001. Para *S. sp.* OF-178 los medios que resultaron más efectivos para seleccionar esta cepa fueron LB 5% CRO<sup>80</sup>, en donde se observó un crecimiento nulo de *P. putida* KT2440, *B. unamae* MTI-641, y *E. sp.* UAPS03001 (Tabla 10) y LB 5 % GM<sup>80</sup>, en donde hubo un crecimiento nulo de *P. putida* KT2440 (Tabla 11). En *P. putida* KT2440 se evaluaron 4 opciones de medios de cultivo (cuatro concentraciones diferentes de CL en medio LB), pero la cepa no pudo seleccionarse completamente. Por ello, se aumentó la concentración de CL<sup>100</sup> a CL<sup>120</sup> (Tabla 13), sin embargo *E. sp.* UAPS03001 y *S. sp.* OF168 no fueron inhibidas por completo, por lo que se adicionó STX<sup>20</sup> al medio de cultivo, observándose que no se inhiben por completo las demás cepas, pero sí disminuye su crecimiento (Tabla 12). Para *E. sp.* UAPS03001, se evaluaron 8

opciones de medio Rojo Congo adicionados con diferentes antibióticos, de las cuales las más efectivas para seleccionar esta cepa fueron RC AK<sup>80</sup> Y RC GM<sup>80</sup> (Tablas 14 y 15), sin embargo se observó que la supervivencia de las demás cepas bacterianas aún fue elevada. Cabe resaltar que en el medio RC GM<sup>80</sup> el número de UFC/mL de *P. putida* KT2440 fue más baja (Tabla 15).

**Tabla 8. Medio selectivo 1 para *B. unamae* MTI-641**

| <b>BAC GM<sup>80</sup></b> |                         |
|----------------------------|-------------------------|
| <b>Cepa bacteriana</b>     | <b>No. UFC/mL</b>       |
| <i>B. unamae</i> MTI-641   | 5.08 x 10 <sup>07</sup> |
| <i>E. sp.</i> UAPS03001    | 1.82 x 10 <sup>07</sup> |
| <i>P. putida</i> KT2440    | 3.62 x 10 <sup>07</sup> |
| <i>S. sp.</i> OF-178       | 2.69 x 10 <sup>07</sup> |

**Tabla 9. Medio selectivo 2 para *B. unamae* MTI-641**

| <b>BAC STX<sup>80</sup></b> |                         |
|-----------------------------|-------------------------|
| <b>Cepa bacteriana</b>      | <b>No. UFC/ mL</b>      |
| <i>B. unamae</i> MTI-641    | 7.64 x 10 <sup>08</sup> |
| <i>E. sp.</i> UAPS03001     | 0                       |
| <i>P. putida</i> KT2440     | 1.99 x 10 <sup>09</sup> |
| <i>S. sp.</i> OF-178        | 6.80 x 10 <sup>05</sup> |

**Tabla 10. Medio selectivo 1 para *S. sp.* OF-178**

| <b>LB 5% CRO<sup>80</sup></b> |                         |
|-------------------------------|-------------------------|
| <b>Cepa bacteriana</b>        | <b>No. UFC/mL</b>       |
| <i>B. unamae</i> MTI-641      | 0                       |
| <i>E. sp.</i> UAPS03001       | 0                       |
| <i>P. putida</i> KT2440       | 0                       |
| <i>S. sp.</i> OF-178          | 1.44 x 10 <sup>05</sup> |

**Tabla 11. Medio selectivo 2 para *S. sp.* OF-178**

| LB 5% GM <sup>80</sup>   |                         |
|--------------------------|-------------------------|
| Cepa bacteriana          | No. UFC/mL              |
| <i>B. unamae</i> MTI-641 | 2.47 x 10 <sup>05</sup> |
| <i>E. sp.</i> UAPS03001  | 1.07 x 10 <sup>08</sup> |
| <i>P. putida</i> KT2440  | 0                       |
| <i>S. sp.</i> OF-178     | 9.22 x 10 <sup>07</sup> |

**Tabla 12. Medio selectivo 1 para *P. putida* KT2440**

| LB STX <sup>20</sup>     |                         |
|--------------------------|-------------------------|
| Cepa bacteriana          | No. UFC/mL              |
| <i>B. unamae</i> MTI-641 | 3.65 x 10 <sup>08</sup> |
| <i>E. sp.</i> UAPS03001  | 2.99 x 10 <sup>08</sup> |
| <i>P. putida</i> KT2440  | 1.66 x 10 <sup>09</sup> |
| <i>S. sp.</i> OF-178     | 5.66 x 10 <sup>08</sup> |

**Tabla 13. Medio selectivo 2 para *P. putida* KT2440**

| LB CM <sup>120</sup>     |                         |
|--------------------------|-------------------------|
| Cepa bacteriana          | No. UFC/MI              |
| <i>B. unamae</i> MTI-641 | 2.72 x 10 <sup>08</sup> |
| <i>E. sp.</i> UAPS03001  | 8.68 x 10 <sup>08</sup> |
| <i>P. putida</i> KT2440  | 2.64 x 10 <sup>09</sup> |
| <i>S. sp.</i> OF-178     | 8.68 x 10 <sup>08</sup> |

**Tabla 14: Medio selectivo 1 para *E. sp.* UAP03001**

| RC AK <sup>80</sup>      |                         |
|--------------------------|-------------------------|
| Cepa bacteriana          | No. UFC/mL              |
| <i>B. unamae</i> MTI-641 | 2.15 x 10 <sup>06</sup> |
| <i>E. sp.</i> UAPS03001  | 9.49 x 10 <sup>07</sup> |
| <i>P. putida</i> KT2440  | 2.33 x 10 <sup>08</sup> |
| <i>S. sp.</i> OF-178     | 5.64 x 10 <sup>08</sup> |



**Tabla 15: Medio selectivo para *E. sp.* UAPS03001**

| RC GM <sup>80</sup>      |                         |
|--------------------------|-------------------------|
| Cepa bacteriana          | No. UFC/mL              |
| <i>B. unamae</i> MTI-641 | 2.15 x 10 <sup>06</sup> |
| <i>E. sp.</i> UAPS03001  | 9.49 x 10 <sup>07</sup> |
| <i>P. putida</i> KT2440  | 2.33 x 10 <sup>08</sup> |
| <i>S. sp.</i> OF-178     | 5.64 x 10 <sup>08</sup> |

Después, se evaluaron distintas combinaciones de los antibióticos anteriores, con el propósito de mejorar la selección para cada cepa bacteriana. Los medios combinados más efectivos para seleccionar a las cepas fueron los siguientes: LB CM<sup>120</sup> STX<sup>20</sup> para *P. putida* KT2440, BAc GM<sup>80</sup> STX<sup>80</sup> para *B. unamae* MTI-641, LB 5% GM<sup>80</sup> CRO<sup>80</sup> para *S. sp.* OF168 y RC GM<sup>80</sup> AK<sup>80</sup> para *E. sp.* UAPS03001. En todos los casos se usaron concentraciones altas de los antibióticos y cabe resaltar que los medios combinados con mayor efectividad fueron RC GM<sup>80</sup> AK<sup>80</sup>, en el que se observó el crecimiento único de *E. sp.* UAPS03001 y BAc GM<sup>80</sup> STX<sup>80</sup>, donde creció *B. unamae* MTI-641 y se evitó el crecimiento de *E. sp.* UAPS03001 y *S. sp.* OF168 después de 24 h de incubación. Estos medios no inhibieron completamente el crecimiento de las otras cepas, ya que después de 48 h de incubación se observó un crecimiento de colonias bacterianas hasta la dilución 4 o 5. Por ello, en algunos casos se recurrió a la identificación de las cepas a través de sus características morfológicas.

**Tabla 16. Medio selectivo combinado para *S. sp.* OF-178**

| LB 5% GM <sup>80</sup> CRO <sup>80</sup> |                         |
|--|-------------------------|
| Cepa bacteriana                          | No. UFC/mL              |
| <i>B. unamae</i> MTI-641                 | 5.02 x 10 <sup>03</sup> |
| <i>E. sp.</i> UAPS03001                  | 2.06 x 10 <sup>03</sup> |
| <i>P. putida</i> KT2440                  | 1.07 x 10 <sup>04</sup> |
| <i>S. sp.</i> OF-178                     | 6.59 x 10 <sup>08</sup> |

**Tabla 17. Medio selectivo combinado para *P. putida* KT2440**

| LB CM <sup>120</sup> STX <sup>20</sup> |                         |
|--|-------------------------|
| Cepa bacteriana                        | No. UFC/mL              |
| <i>B. unamae</i> MTI-641               | 3.06 x 10 <sup>06</sup> |
| <i>E. sp.</i> UAPS03001                | 0                       |
| <i>P. putida</i> KT2440                | 1.17 x 10 <sup>09</sup> |
| <i>S. sp.</i> OF-178                   | 1.82 x 10 <sup>07</sup> |

**Tabla 18. Medio selectivo combinado para *B. unamae* MTI-641**

| BAc GM <sup>80</sup> STX <sup>80</sup> |                         |
|--|-------------------------|
| Cepa bacteriana                        | No. UFC/mL              |
| <i>B. unamae</i> MTI-641               | 7.64 x 10 <sup>08</sup> |
| <i>E. sp.</i> UAPS03001                | 0                       |
| <i>P. putida</i> KT2440                | 1.26 x 10 <sup>06</sup> |
| <i>S. sp.</i> OF-178                   | 0                       |

**Tabla 19. Medio selectivo combinado para *E. sp.* UAPS03001**

| RC GM <sup>80</sup> AK <sup>80</sup> |                         |
|--------------------------------------|-------------------------|
| Cepa bacteriana                      | No. UFC/mL              |
| <i>B. unamae</i> MTI-641             | 0                       |
| <i>E. sp.</i> UAPS03001              | 5.33 x 10 <sup>09</sup> |
| <i>P. putida</i> KT2440              | 0                       |
| <i>S. sp.</i> OF-178                 | 0                       |

## 8.2. Antagonismo

### 8.2.1. Inhibición simultánea bacteria-bacteria.

En los ensayos de inhibición simultánea no se observó inhibición alrededor del crecimiento de las cepas usadas como productoras, por lo que en las diferentes combinaciones evaluadas (productora/sensible) se observó que las 4 cepas pueden coexistir en el medio de cultivo cuando crecen de manera simultánea. (Figura 3).

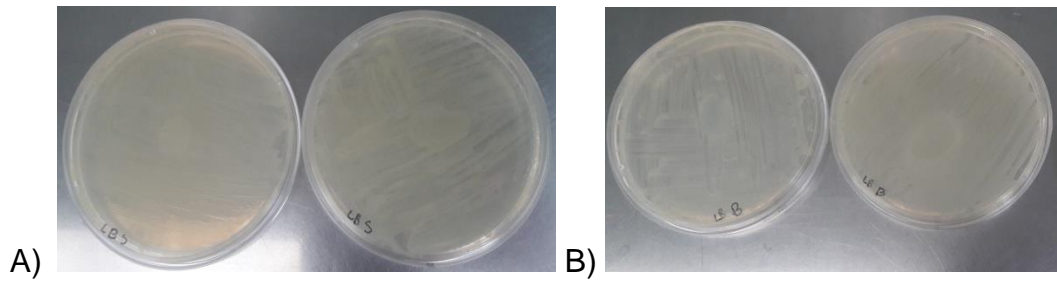


Figura 3. Placas de los experimentos de inhibición simultánea en donde se usó a *P. putida* KT2440 como cepa productora y a *B. unamae* MTI-641 (A) y *S. sp.* OF168 (B) como cepas sensibles.

### 8.2.2. Inhibición por doble capa bacteria-bacteria

Al evaluar las 4 cepas como productoras en los ensayos de doble capa no se observó inhibición de las cepas probadas como sensibles. Solo en el caso de *E. sp.* UAPS03001 se presentó un retardo en su crecimiento cuando fue probada como cepa sensible, por lo que requirió de un mayor tiempo de incubación sin que se viera inhibida por las cepas productoras.

### 8.2.3. Inhibición por doble capa bacteria-hongo

Al evaluar las cuatro cepas bacterianas como productoras y al hongo *Rhizopus* como sensible, se observó que el crecimiento del hongo no fue inhibido por ninguna de las cuatro cepas bacterianas (Figura 4).

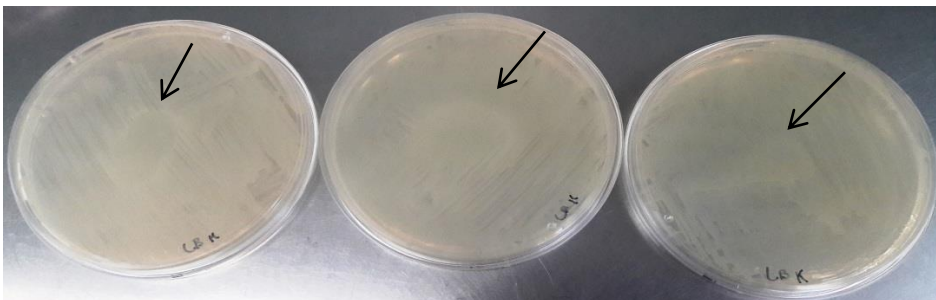
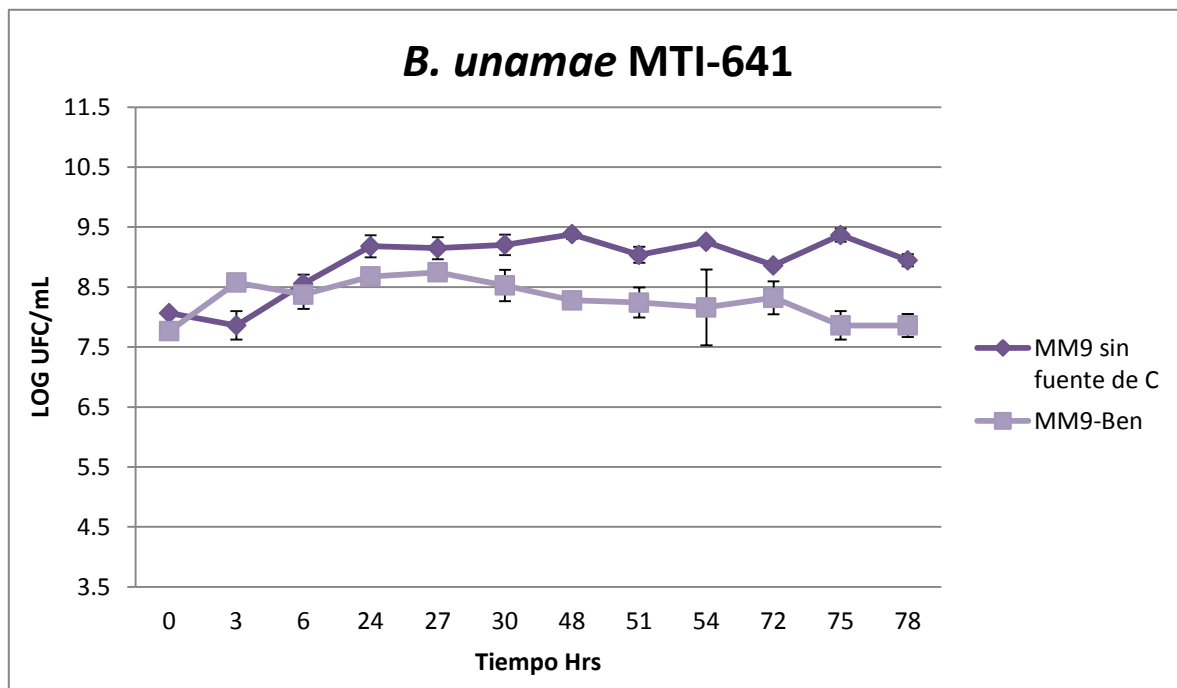
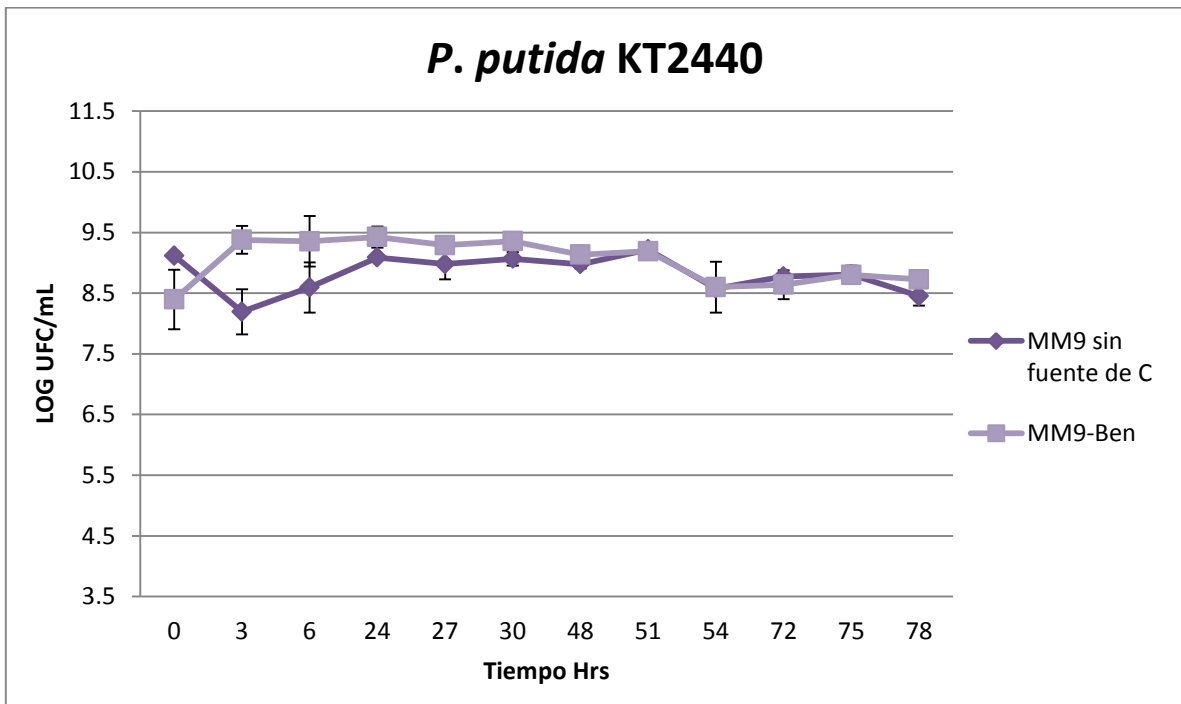
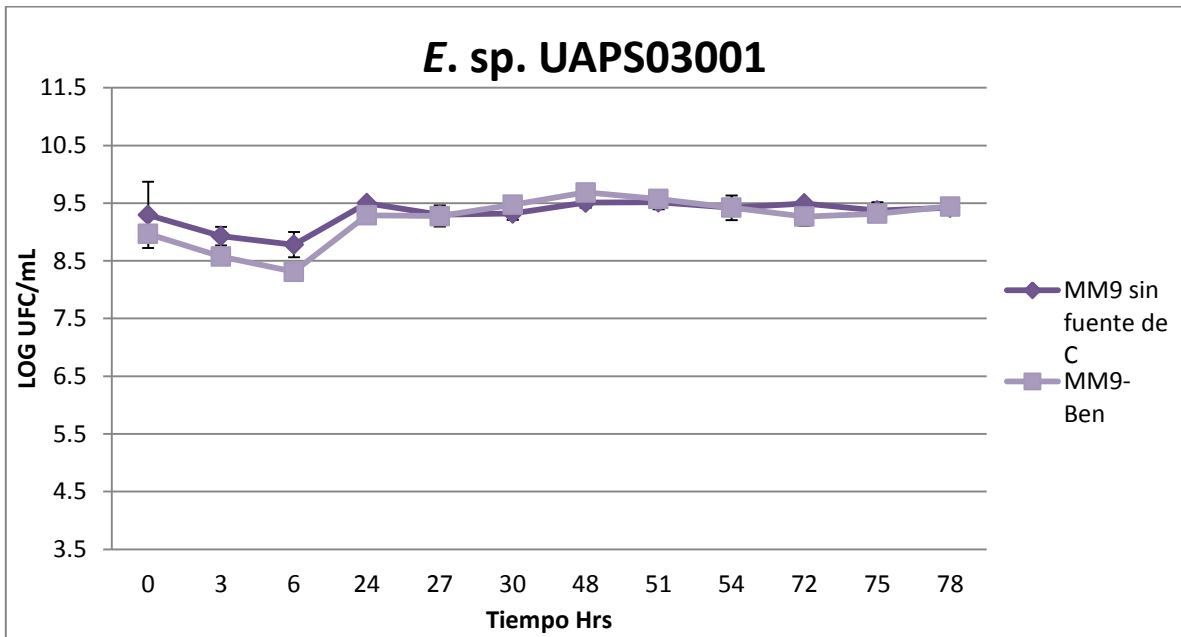


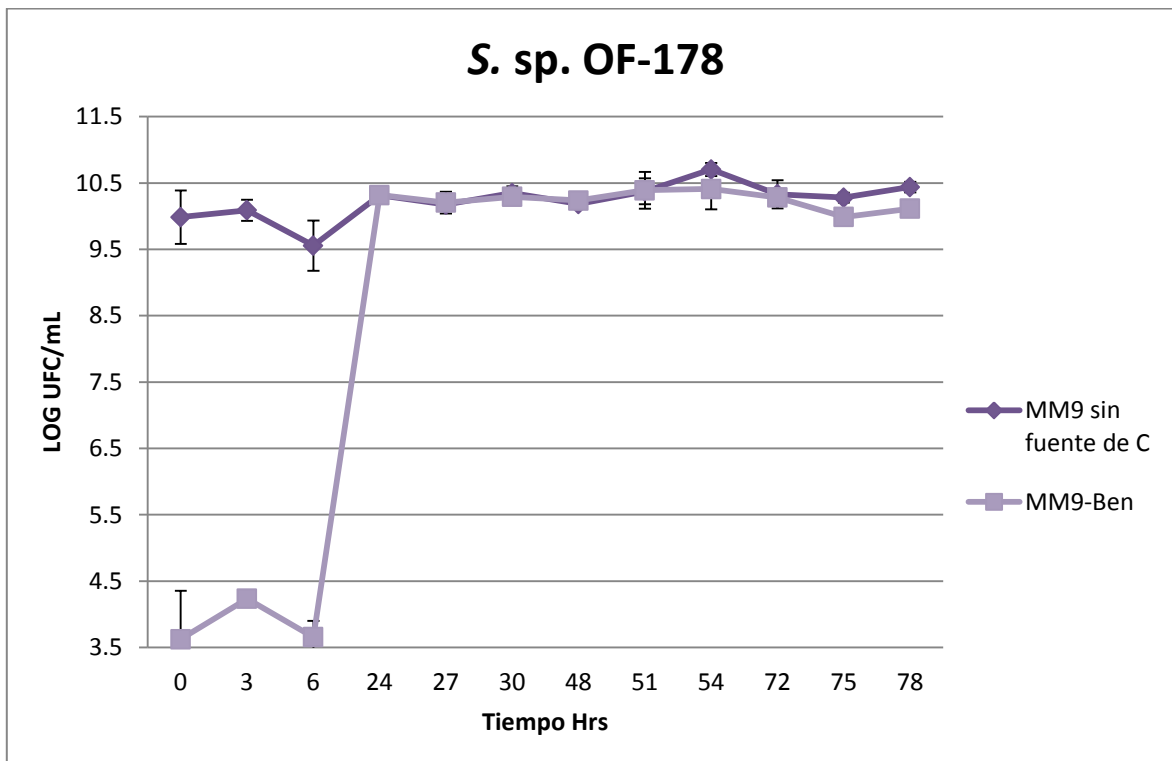
Figura 4. Placas del experimento de doble capa usando a *P. putida* KT2440 como cepa productora y el hongo *Rhizopus* como sensible, se muestra el crecimiento de hongo *Rhizopus* en medio LB.

### 8.3. Curvas de crecimiento y turbidez con benomilo

Los resultados muestran que las cuatro cepas evaluadas crecieron en los medios MM9 sin fuente de carbono y MM9-Ben, observándose que *P. putida* KT2440, *S. sp* OF-178 y *E. sp* UAPS03001 presentaron cuantificaciones de colonias similares en medio con benomilo. *S. sp.* OF-178 fue la cepa que presentó la mayor cantidad de UFC/mL en las 2 condiciones en las cuales fue crecida (medio MM9 y MM9-Ben). En *B. unamae* MTI-641, se observó un menor crecimiento en el medio adicionado con benomilo con respecto al medio sin este compuesto. Para el caso de *P. putida* KT2440 la población bacteriana fue ligeramente mayor durante las primeras h de crecimiento, sin embargo en los siguientes tiempos experimentales evaluados, la población bacteriana en ambos medios de cultivo fue similar. La población inicial de *S. sp.* OF-178 fue muy baja en las primeras h de incubación, sin embargo a partir de las 6 h de incubación la población se incrementó y se mantuvo constante durante el resto del experimento (Figura 5)



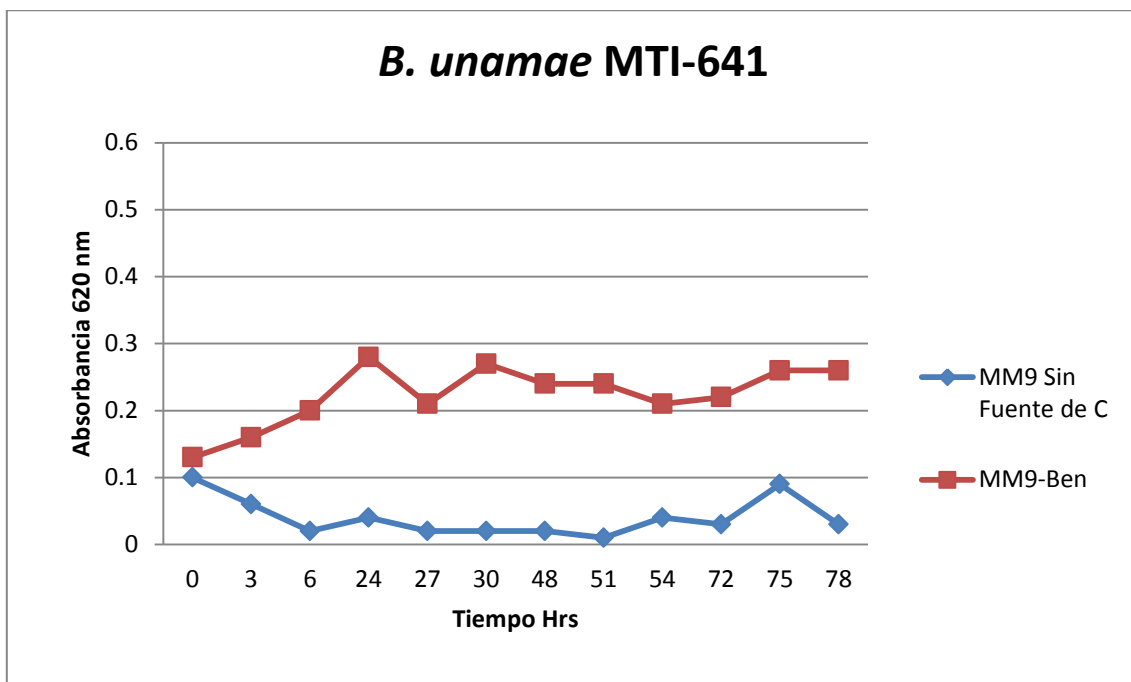
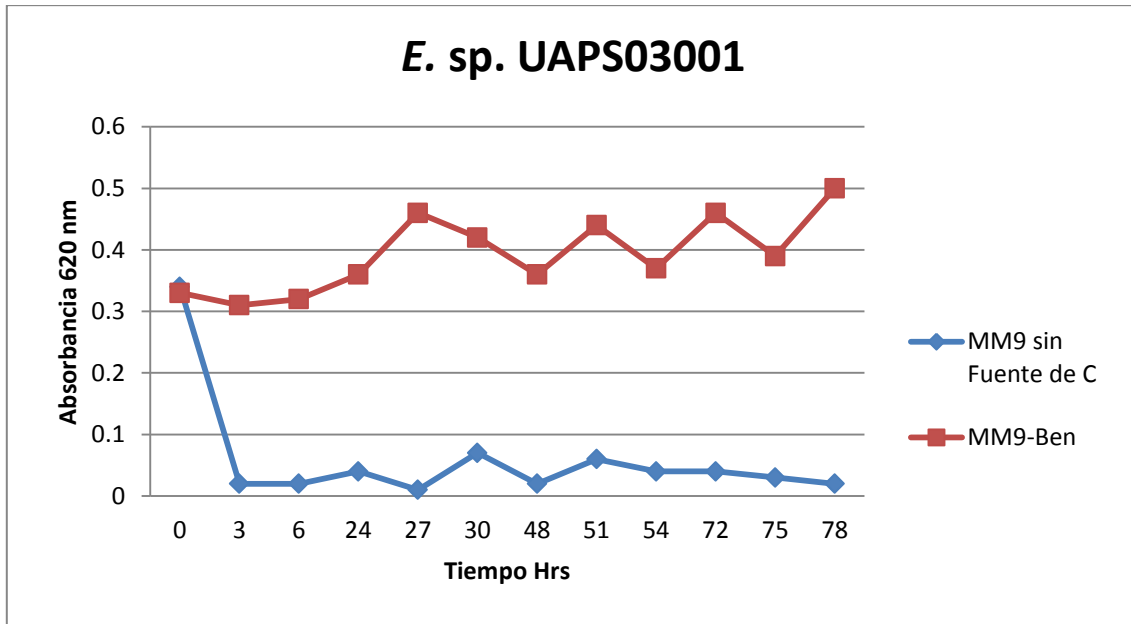




**Figura 5. Curvas de crecimiento de *B unamae* MTI-641, *S. sp. OF-178* y *E. UAPS03001*, *P. putida* KT2440, *S. sp. OF-178* crecidas en medio mínimo sin fuente de carbono (morado) y medio mínimo con benomilo (lila), para evaluar el crecimiento y posible utilización de este fungicida como única fuente de carbono. La cuantificación se llevó a cabo en medio gelificado LB.**

En los registros de la absorbancia, se observó que *E. sp. UAPS03001* en el medio MM9-Ben presentó un incremento en la absorbancia a partir de las 24 h de incubación, aunque a partir de ese tiempo se registraron fluctuaciones, mientras que el medio sin fuente de carbono solo tuvo ligeras fluctuaciones en la absorbancia sin que se presentara un incremento. Para el cultivo de *B. unamae* MTI-641 en el medio MM9-Ben, también existieron algunas fluctuaciones en la absorbancia, presentándose dos incrementos a las 24 y 77 h, mientras que la absorbancia del cultivo en medio MM9 sin fuente de carbono se mantuvo constante. En el cultivo de *P. putida* KT2440 en MM9-Ben la absorbancia no mostró una tendencia al incremento, solo a partir de las 72 h se presentaron fluctuaciones, que se mantuvieron hasta las últimas horas del experimento, mientras que el cultivo en medio MM9 sin fuente de carbono no presentó incrementos notables en la absorbancia, únicamente un aumento a las 48 h de incubación, el cual disminuyó a valores similares en las últimas h del experimento.

Para el caso de *S. sp.* OF-178, la absorbancia del cultivo de MM9-Ben tuvo un ligero incremento durante las primeras horas del experimento. Sin embargo, después de las 24 h de incubación presenta una disminución, manteniéndose en valores constantes, lo cual fue similar para el cultivo en MM9 sin fuente de carbono, incluso las variaciones en la absorbancia fueron mínimas (Figura 6).



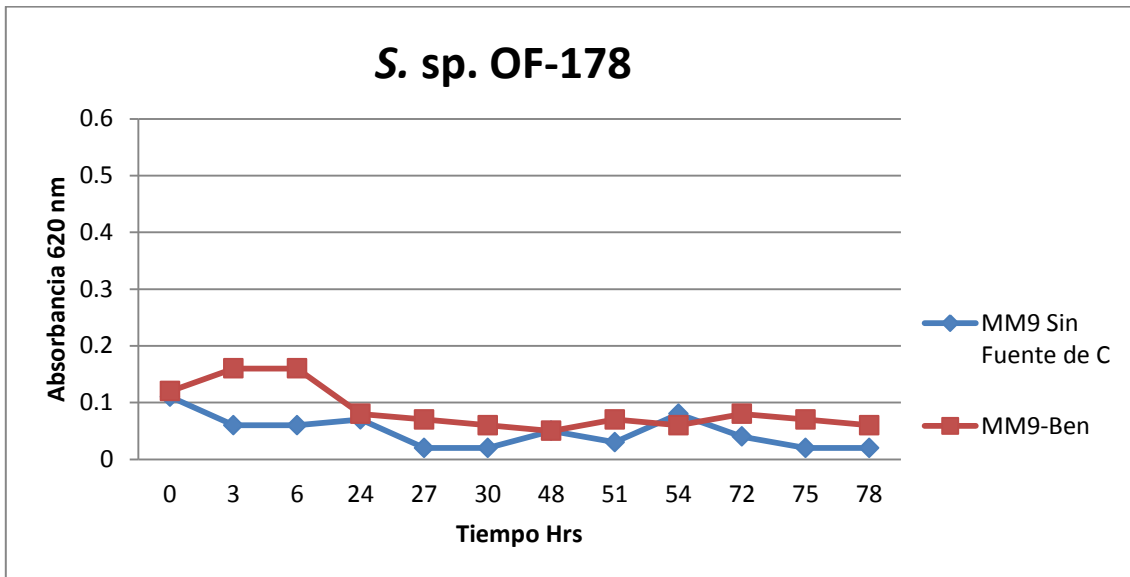
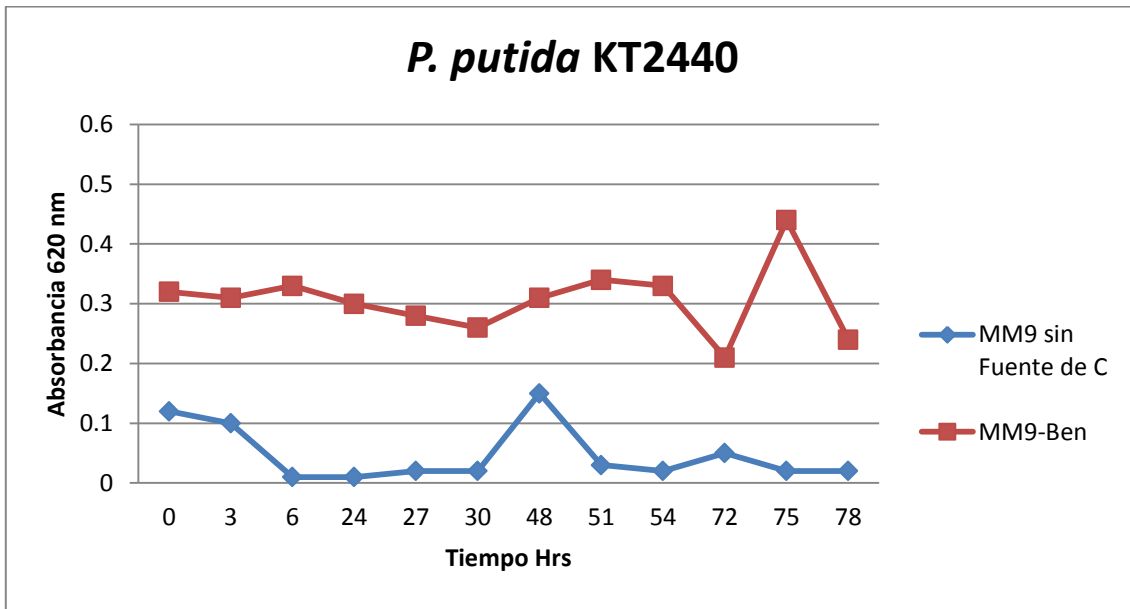


Figura 6. Medición de la densidad óptica de medio mínimo líquido inoculados con a) *B. unamae* MTI-641 b) *E. UAPS030001*, c) *P. putida* KT2440 y d) *S. sp.* OF-178 para evaluar la posible utilización del fungicida benomilo como única fuente de carbono.

#### 8.4. Crecimiento del hongo *Rhizopus* en medios con benomilo en donde se crecieron previamente cepas bacterianas

El hongo *Rhizopus* no fue capaz de crecer en las placas de medio de cultivo adicionadas con benomilo en donde previamente fueron crecidas las cepas *B. unamae* MTI-641 y *E. sp.* UAPS030001. Sin embargo, se observó un crecimiento del hongo en el medio donde previamente crecieron *P. putida* KT2440 y *S. sp.*



OF-178, siendo mayor el crecimiento del hongo en la placa donde previamente creció *S. sp* OF-178, por lo que se sugiere que el hongo fue capaz de crecer en estos medios, debido a que las bacterias fueron capaces de eliminar parte del fungicida.

### 8.5. Crecimiento de *G. diazotrophicus* PAL5<sup>T</sup> en medios con benomilo, en donde se crecieron previamente las cepas bacterianas con potencial de biodegradación.

*G. diazotrophicus* PAL5<sup>T</sup> fue capaz de crecer en los 5 medios adicionados con benomilo en donde previamente crecieron las 4 cepas de manera individual y en consorcio. El crecimiento de *G. diazotrophicus* PAL5<sup>T</sup> fue mayor en los medios SYP adicionados con medio SYP Ben esterilizado en donde se creció previamente a *S. sp.* OF-178 y *P. putida* KT2440, mientras que el tratamiento adicionado con medio SYP Ben esterilizado en donde se creció previamente a *E. sp.* UAPS03001 fue el que presentó un menor crecimiento de *G. diazotrophicus* PAL5<sup>T</sup>. Es importante mencionar que en los medios provenientes de cultivos donde se crecieron previamente *P. putida* KT2440, *S. sp.* OF-178 se observaron colonias puntiformes durante las primeras 48 h de incubación, por lo que fue necesario incubar por un tiempo mayor para realizar la cuantificación de UFC/mL.

**Tabla 19: Medios SYP inoculados con las 4 cepas bacterianas y consorcio**

| Medio SYP + Ben inoculado con cepas individuales + SYP/consorcio + SYP | Logaritmo del número de UFC/mL <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 <sup>T</sup> | Desviación estándar |
|--|---|---------------------|
| SYP Ben sin inocular + SYP   | 0   | 0                   |
| SYP Ben con <i>P. putida</i> KT2440 + SYP                              | 9.0999  | 0.1487              |
| SYP Ben con <i>S. sp.</i> OF-178 + SYP                                 | 9.4147  | 0.4631              |
| SYP Ben con <i>B. unamae</i> MTI-641 + SYP                             | 8.4805  | 0.1732              |
| SYP Ben con <i>E. sp.</i> UAPS03001 + SYP                              | 7.7535  | 0.3012              |
| SYP Ben con Consorcio + SYP  | 8.7742  | 0.2678              |

## 8.6. Cuantificación de benomilo por HPLC a partir de extractos de medios inoculados con bacterias

El benomilo fue detectado a través de un instrumental de cromatografía de gases-espectrometría de masas. En el cromatograma no se observó el tiempo de retención de la molécula de benomilo, sino el tiempo de retención del ácido carbámico, que es un producto de descomposición de esta molécula, el cual fue de 10.810 min (Figura 7). Los perfiles de masas de los productos de descomposición del benomilo permitieron observar las siguientes moléculas: ácido carbámico (Figura 8) y fenetilamina-dimetil (Figura 9). La molécula del ácido carbámico fue usada como referencia para los siguientes experimentos.

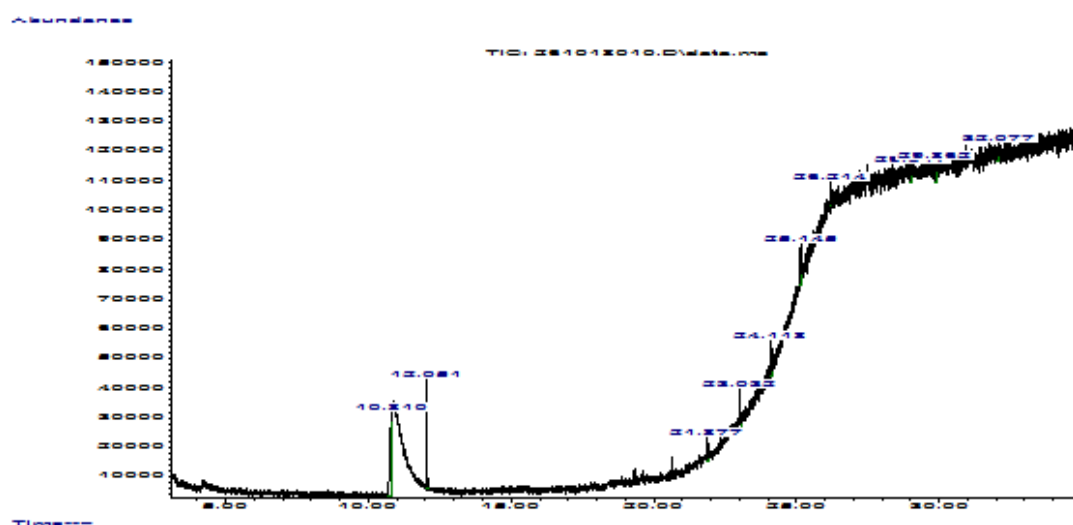


Figura 7. Cromatograma de la solución con benomilo utilizada en los experimentos, en donde se observa, un pico que corresponde al tiempo de retención de 10.810 correspondiente a la molécula del ácido carbámico

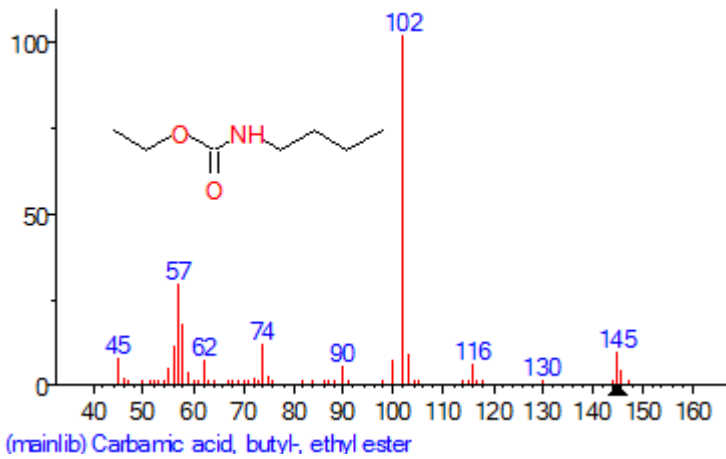


Figura 8. Perfil de masas de ácido carbámico, un producto de descomposición del benomilo.

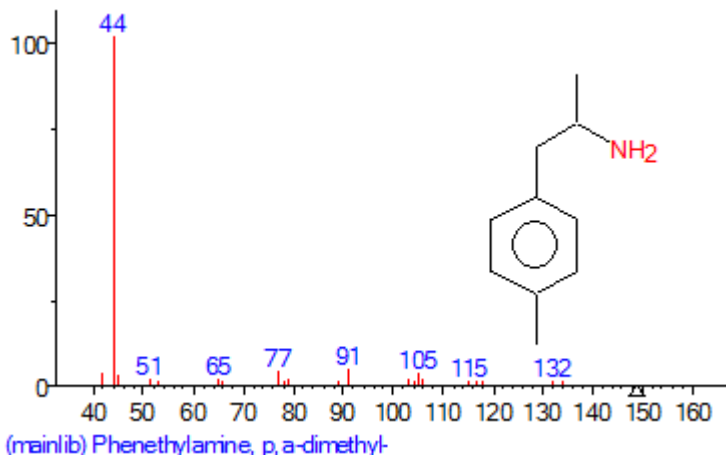
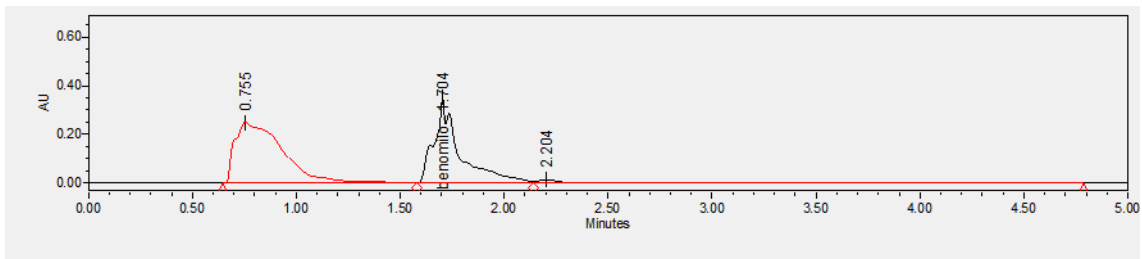


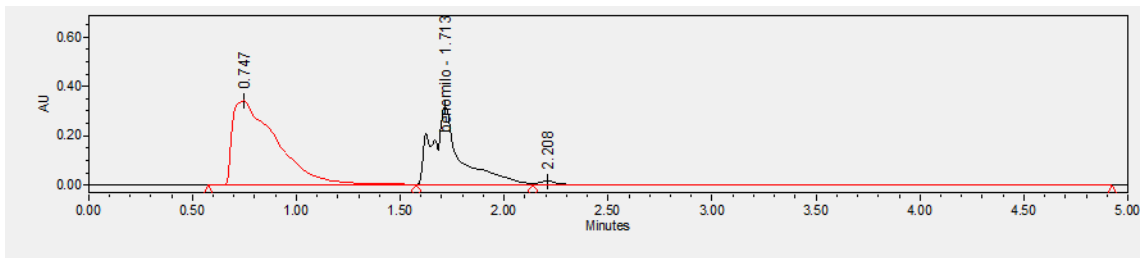
Figura 9. Perfil de masas de fenetilamina-dimetil, un producto de descomposición del benomilo.

Después de la extracción líquido-líquido, las muestras se sometieron a una prueba de HPLC, donde los resultados mostraron que el extracto que provenía del medio de cultivo en donde fue crecido previamente el consorcio bacteriano, presentó una menor cantidad de benomilo (tiempo de retención de 1.704 min y una concentración de 1.724  $\mu\text{g/mL}$ ) seguido por el tratamiento de *P. putida* KT2440 (concentración de 1.877  $\mu\text{g/mL}$ ). En el tratamiento de la cepa *B. unamae* MTI-641 se observó una mayor cantidad de benomilo con respecto a las otras 3 cepas y el consorcio (concentración de 2.169  $\mu\text{g/mL}$ ). Por otra parte, los tratamientos de *B. uname* MTI-641 y *S. sp.* OF-178, mantuvieron una cantidad similar de benomilo (Figura 8; Tabla 17).

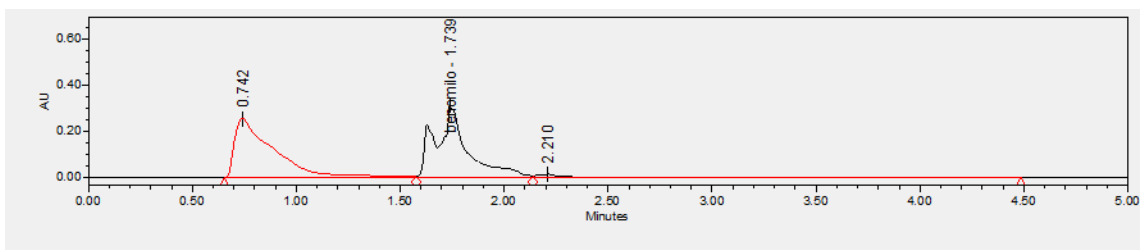
## Consortio



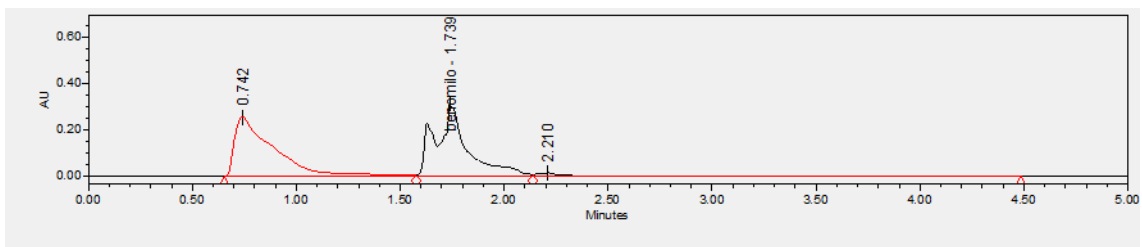
## *P. putida* KT2440



## *B. unamae* MTI-641



## *S. sp.* OF-178



*E. sp.* UAPS03001

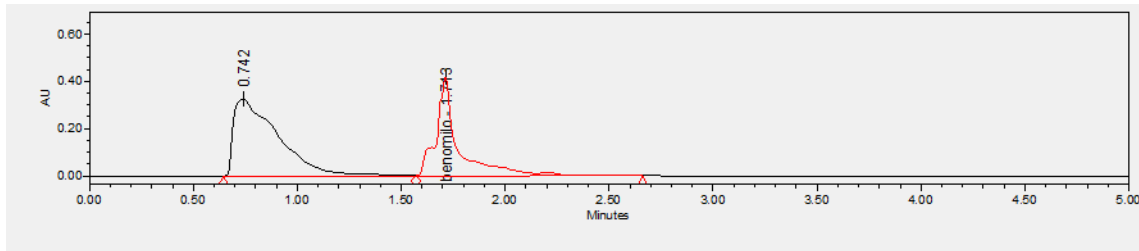


Figura 10. Resultados del perfil de HPLC de las 4 cepas bacterianas *P. putida* KT2440, *B. unamae* MTI-641, *S. sp.* OF-178, *E. sp.* UAPS03001, el consorcio formado por estas 4 cepas. Y el control sin inocular.

Tabla 17. Concentración de benomilo después de 15 días de crecimiento de las 4 cepas bacterianas, el consorcio y el medio sin inocular

| CEPA BACTERIANA          | Concentración de benomilo ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|--------------------------|--|
| CONTROL SIN INOCULAR     | 10   |
| <b>CONSORCIO</b>         | 1.724  |
| <i>B. unamae</i> MTI-641 | 2.169  |
| <i>E. sp.</i> UAPS03001  | 1.914  |
| <i>P. putida</i> KT2440  | 1.877  |
| <i>S. sp.</i> OF-178     | 1.933  |

Los cálculos se obtuvieron a partir de los tiempos de retención de HPLC y una curva de calibración de benomilo

## 9. DISCUSIÓN

Las bacterias benéficas PGPR son una parte esencial en diversos ciclos químicos de la biósfera, siendo unos de los principales el de descomposición e integración de la materia y de interacción con otros organismos. En la literatura se ha reportado que diferentes especies bacterianas tienen la capacidad de degradar compuestos xenobióticos, muchos de ellos presentes en los agroquímicos (Ndayambaje, et al., 2019; Rahaman, et al., 2018) Por ello, una alternativa ante los efectos nocivos de estos compuestos en el ambiente, consiste en la utilización estas bacterias para la eliminación de estos en los terrenos de cultivo. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de 4 cepas PGPR para contribuir a la degradación del fungicida benomilo, de manera individual o en consorcio.

En nuestros experimentos, *P. putida* KT2440 fue la cepa más efectiva en disminuir la concentración de benomilo en el medio de cultivo sin fuente de carbono, por lo que se sugiere que esta bacteria podría estar metabolizando este compuesto. Se ha reportado que *P. putida* y algunas cepas del género *Enterobacter* poseen la capacidad de degradar compuestos tóxicos (Jiménez Torres, 2014) como los hidrocarburos, y derivados del mercurio. Otro caso importante es el reportado por (Colorado et al., 2016) en donde se demuestra que ambos géneros son capaces de degradar pesticidas organoclorados.

*B. unamae* MTI-641 fue la cepa que presentó menor efectividad para disminuir la concentración de benomilo en el medio de cultivo líquido donde fue crecida, lo cual se observó a través de los resultados obtenidos por HPLC. En medio líquido con benomilo, esta bacteria presentó un fenómeno de aglomeración de las células, así como una disminución en la turbidez del medio, por lo que esta característica y el incremento de UFC/mL no parece tener una relación directa con la disminución en la concentración de benomilo. (Rodríguez-Andrade O., 2009) reportó previamente que el número de UFC/mL de *B. unamae* MTI-641 fue constante en medio mínimo con benomilo como única fuente de carbono, después de 3 días de incubación. Sin embargo, se observó un incremento en la concentración de proteínas del cultivo al final del experimento. La diferencia en los resultados de ese estudio reportado previamente con respecto al nuestro, se encuentra posiblemente en que los experimentos del primer estudio se realizaron en un medio líquido que

permaneció sin agitación, mientras que en el presente trabajo se utilizó una primera fase, en la que el cultivo permaneció en agitación constante, con luz durante la incubación y una fase en la que el cultivo permaneció estático y en ausencia de luz. Sin embargo, no podemos descartar que esta bacteria pueda degradar benomilo, ya que en nuestro estudio observamos que un hongo del género *Rhizopus* (sensible a benomilo) es capaz de crecer en un medio gelificado con benomilo en donde previamente fue crecida la bacteria, por lo que se sugiere que podría estar degradando parte de este compuesto en el medio. Este mismo efecto fue observado para *E. sp.* UAPS03001.

Se ha comprobado a nivel mundial que el género *Sphingomonas* tiene potencial como bacteria biodegradadora de compuestos metilcarbamatos. La ruta que utiliza es la hidrólisis del carbofuram, lo que lo convierte en un agente menos tóxico (Castellanos Rozo & Rache Cardenal, 2013). Esta capacidad metabólica tan versátil que tiene, la convierte en un microorganismo excelente para la degradación (Castellanos- Rozo, Lopez Galvis, & Mendivelso Carreño, 2016). En este trabajo, *S. sp.* OF-178 redujo la concentración de benomilo en los experimentos donde se creció en medio líquido con este compuesto como única fuente de carbono.

En este trabajo se observó que el consorcio bacteriano integrado por cuatro cepas bacterianas disminuyó más eficientemente la concentración de benomilo, en medio líquido con este compuesto como única fuente de carbono, con respecto a las cepas evaluadas de manera individual, por lo que se sugiere que la coexistencia de estas bacterias estaría mejorando la capacidad de degradación de benomilo. En la literatura se ha propuesto que los consorcios bacterianos pueden ser una opción para la biorremedación de suelos contaminados con diversos compuestos químicos que pueden alterar el balance de la microbiota que ahí habita (Li et al., 2017; Perruchon et al., 2017). Se ha sugerido que la utilización de un consorcio endógeno o nativo, conformado por cepas nativas del suelo y rizosfera es una mejor opción, ya que estas degradan los contaminantes locales de forma más eficiente las cepas extraídas de otra región (Tirado Torres et al., 2015). También existen estudios que demuestran que una sola cepa bacteriana no es capaz de degradar al contaminante tan eficientemente y es por eso que se

utilizan cepas bacterianas en consorcio, que generan metabolitos secundarios, que otra cepa del mismo es capaz de metabolizar en componentes más simples o lograr la degradación completa del compuesto (Técher et al., 2011). Existe un estudio en el que se ha reportado que un consorcio bacteriano que contiene bacterias del género *Sphingomonas*, puede degradar al fungicida tiabendazol (Perruchon et al., 2017). Por ello, resulta posible que el efecto de degradación del fungicida benomilo por medio del consorcio bacteriano evaluado en nuestro estudio, se deba en parte a *S. sp.* OF-178.

El benomilo es un fungicida ampliamente utilizado por los agricultores en México, debido al bajo costo al que se oferta y la facilidad para encontrarlo. Sin embargo, se ha demostrado que tiene efectos adversos en el diversos mamíferos, entre ellos el ser humano y reptiles (Molina, 2012). Por ello, se propone que la utilización del consorcio bacteriano evaluado en este trabajo contribuirá a la eliminación de este fungicida de los terrenos de cultivo, para lo cual se requerirán estudios posteriores, en los que se lleve a cabo la inoculación del mismo en la rizósfera de plantas y se evalúe su capacidad de eliminación del compuesto bajo esas condiciones. En el presente trabajo, también se encontraron algunos medios de selección para las cuatro cepas evaluadas, los cuales contienen más de un antibiótico. Estos medios permitirán la selección de cada una de las cepas a partir de la inoculación del consorcio bacteriano formado por las mismas en experimentos posteriores.



## 10. CONCLUSIONES

- Se encontraron medios de selección para *P. putida* KT2440, *B. unamae* MTI-641, *E. sp.* UAPS3001 y *S. sp.* OF-178. Sin embargo, para algunos casos no se obtuvo completamente la selección, por lo que será necesario recurrir a la evaluación de algunas características morfológicas cuando se realice la selección a partir del consorcio.
- Las 4 cepas bacterianas pueden coexistir en consorcio, lo cual fue mostrado en los experimentos de antagonismo bacteria-bacteria.
- El hongo del género *Rhizopus* (sensible a benomilo) fue capaz de crecer en medio de cultivo gelificado adicionado con el fungicida, donde previamente fueron crecidas *B. unamae* MTI-641 y *E. sp.* UAPS03001, lo que sugiere que podrían estar degradando este compuesto
- *E. sp.* UAPS0300S presentó una menor efectividad para degradar al xenobiótico benomilo, tanto en medio líquido así como en medio gelificado.
- El consorcio bacteriano formado por las cuatro cepas mostró una mayor capacidad para disminuir la concentración de benomilo en medio líquido, con respecto a las cepas individuales.
- *G. diazotrophicus* PAL5<sup>T</sup> fue capaz de crecer en los 5 medios adicionados con benomilo en donde previamente crecieron las 4 cepas de manera individual y en consorcio.
- De las cuatro cepas evaluadas, *P. putida* KT2440 fue la bacteria que redujo en mayor cantidad la concentración del xenobiótico benomilo como única fuente de carbono en medio MM9-Ben líquido, cuando es crecida de manera individual.

## 11. PERSPECTIVAS

- Realizar la inoculación de plantas de frijol *Phaseolus vulgaris* con las cepas individuales y en consorcio, para determinar si son capaces de adherirse y colonizar la rizósfera.
- Llevar a cabo experimentos para evaluar la degradación de benomilo por las cuatro cepas, de manera individual y en consorcio, asociadas a la rizósfera de plantas de frijol.
- Determinar cuáles son las moléculas que resultan de la degradación del benomilo por el consorcio bacteriano usado en este trabajo, mediante el uso de técnicas cromatográficas, HPLC o Cromatografía de Gases – Masa

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Alanís, E., & Guerrero, I. (2004). Pseudomonas en Biotecnología. *Revista Biotecnología*, 09(1), 26–37.
- Alonso, G., Alonso, G., Gabriel, J., Gutiérrez-alonso, O., Uxmal, C. E., Sucursal, A. P., ... Correspondencia, M. C. P. (2003). Evaluación de Resistencia a Benomil , Thiabendazol y Azoxystrobin para el Control de Antracnosis [ Colletotrichum gloeosporioides ( Penz .) Penz . and Sacc .] en Frutos de Guayaba ( Psidium guajava L .) en Postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 228–232.
- Arrieta Ramírez, O., Rivera Rivera, A., Arias Marin, L., Rojano, B., Ruiz, O., & Cardona Gallo, S. (2012). Biorremediación de un suelo con diésel Mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Gestión y Ambiente*, 15.
- Barranco Cuellar, V. (2016). *Efectos del Benomilo sobre el crecimiento de Salvia hipanica L. Y uso de bacterias rizosfericas para contrarestar sus efectos toxicos.*
- Bashan, Y., Salazar, B. G., Moreno, M., Lopez, B. R., & Linderman, R. G. (2012). Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *Journal of Environmental Management*, 102, 26–36.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria ( PGPR ): Their potential as antagonists and biocontrol agents, 4, 1044–1051.
- Bertona, E., Radice, M., Rodríguez, C. H., Barberis, C., Vay, C., Famiglietti, A., & Gutkind, G. (2005). Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia enzimática a las cefalosporinas de tercera generación en Enterobacter spp . *Revista Argentina de Microbiología*, 37, 203–208.
- Caballero Mellado, J., Martínez Aguilar, L., Paredes Valdez, G., & Estrada de los Santos, P. (2004). Burkholderia unamae sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary*

*Microbiology*, 54(4), 1165–1172.

- Castellanos- Rozo, J., Lopez Galvis, J., & Mendivelso Carreño, A. (2016). BIODEGRADACIÓN DE CARBOFURAN Y CARBARIL POR *Sphingomonas* sp . , S8-M3-13. *Agronomía & Ambiente*, (September).
- Castellanos Rozo, J., & Rache Cardenal, L. Y. (2013). DEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS N-METILCARBAMATOS. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 105–119.
- Chiocchio, V. M. (2000). *Influencia de las raíces sobre las poblaciones fúngidas del suelo : efecto rizoplano-rizósfera*. Universidad de Buenos Aires.
- Colorado, B. E. J., Tobon, A. B., & Ballestas, I. T. (2016). Organophosphorus pesticides degrading bacteria present in contaminated soils. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 25(3), 13–22.
- Coppotelli, B., Ibarrolaza, A., Panno, T. Del, & M Morelli, I. (2008). Effects of the Inoculant Strain *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA on Soil Bacterial Community and Biodegradation in Phenanthrene-contaminated Soil. *Microbial ecology.*, 55(March), 173–183.
- Corral Lugo, A., Morales García, Y. E., Pazos Rojas, L. A., Ramírez Valverde, A., Martínez Contreras, R., & Muñoz Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo. *Colombia Biotecnológica*, 14(2), 147–156.
- Dangond Araujo, J. J., & Guerrero Dallos, J. A. (2006). Metodología para la determinación de residuos de fungicidas benzimidazólicos en fresa y lechuga por HPLC-DAD. *REVISTA COLOMBIANA DE QUÍMICA*, 35(1), 67–79.
- El-Amier, Y. A., Alghanem, S. M., & Alzuaibr, F. M. (2017). Bioaccumulation and Translocation of Heavy Metals from Coastal Soil by Wild Halophytes. *American Journal of Environmental Protection*, 5(2), 52–60.
- Feng, G. Da, Yang, S. Z., Wang, Y. H., Zhang, X. X., Zhao, G. Z., Deng, M. R., & Zhu, H. H. (2014). Description of a Gram-negative bacterium, *Sphingomonas guangdongensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary*

*Microbiology*, 64(PART 5), 1697–1702.

- Fredrickson, J. K., Balkwill, D. L., Romine, M. F., & Shi, T. (1999). Ecology, physiology, and phylogeny of deep subsurface sphingomonas sp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(4–5), 273–283.
- Gerhardt, K., Huang, X.-D., Glick, B., & Greenberg, B. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*, 20–30.
- Gordillo Delgado, F., Marín, E., & Calderón, A. (2016). Effect of Azospirillum brasilense and Burkholderia unamae Bacteria on Maize Photosynthetic Activity Evaluated Using the Photoacoustic Technique. *International Journal of Thermophysics*, 37(9), 1–11.
- Hoben, H. J., & Somasegaran, P. (1982). Comparison of the Pour , Spread , and Drop Plate Methods for Enumeration of Rhizobium spp . in Inoculants Made from Presterilized Peatt, 44(5), 1246–1247.
- Ibarz, R., Garvín, A., Pagán, J., & Ibarz, A. (2015a). Fotodescomposición de benomilo en solución acuosa. *Afinidad -Barcelona*, 56.(34), 53–56.
- Ibarz, R., Garvín, A., Pagán, J., & Ibarz, A. (2015b). Modelización cinética de la degradación fotoquímica de benomilo. *Afinidad -Barcelona*, 72, 108–113.
- Izquierdo - Romero, A. R. (2013). Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo . Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales, 270. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10803/132994>
- Jimenez, J., Miñambres, B., García, J., & Díaz, E. (2002). Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from Pseudomonas putida KT2440. *Environ Microbiol*, 824–841. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13586.81608>
- Jiménez Torres, A. C. de J. (2014). *Degradación de los plaguicidas endosulfán y malatión por cepas bacterianas aisladas de suelo agrícola*. Universidad Veracruzana.

- Jonhson, W. (1980). *Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and acuatic invertebrates*. U.S. Fish & Wildlife Service,.
- Kaastra-Howeler, L., & Gams, W. (1973). Preliminary study on the effect of benomyl on the fungal flora in a greenhouse soil. *Neth J Plant Pathol*, 79, 516–518.
- Kent, A. D., & Triplett, E. (2002). Microbial Communities and Their Interacctions in Soil and Rhizosphere Ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, 56, 211–236.
- Li, C., Lv, T., Liu, W., Zang, H., Yi, C., & Li, D. (2017). Efficient degradation of chlorimuron-ethyl by a bacterial consortium and shifts in the aboriginal microorganism community during the bioremediation of contaminated-soi. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139, 423–430.
- López Martínez, S., Gallegos, M. E., Pérez Flores, L. J., & Gutiérrez Rojas, M. (2005). Mecanismos de fitorremedación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 21(2), 91–100.
- López Núñez, R., Vong Meas, Y., Borges Ortega, R., & Olguín, E. J. (2004). Fitorremediación : fundamentos y aplicaciones. *Ciencia*, 69–83.
- López, S., Medina, R. ;, Franco, M., , Ballatti, P., & . (1991). Bacterias del suelo y su capacidad para inhibir a hongos patógenoa de las plantas.
- Madueño, L., Coppotelli, B. M., & Morelli, I. S. (2009). Efecto de la inoculación de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA sobre la composición de un consorcio bacteriano degradador de fenantreno. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(2), 65–72.
- Martinez Canchignia, Hayron Cruz Rosero, N., Barrera Álvarez, Alexandra Morante Carriel, J., Canchignia Malagón, G., & Peñafiel Jaramillo, M. (2015). Aplicación de Rizobacterias que promueven el crecimiento en plantas (PGPR) del género. *Ciencias agrarias*, 8(1), 25–35.
- Martínez Cortazar, A., González Ramírez, C., Corone Olivares, C., Escalante Lozada, J., Castro Rosas, J., & Villagómez Ibarra, J. (2012). Biotecnología

- aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. *Universidad y ciencia*, 28(2), 187–199.
- Meagher, R. B. (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(2), 2000.
- Mehnaz, S., Mirza, M. S., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., Bano, A., & Malik, K. A. (2001). Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice, (December 2014).
- Mendo Pascual, W. L. (2014). *Alternativa de biorremediación con bacterias autóctonas de sedimento contaminado de la Laguna de Tamiahua, Veracruz, México*.
- Miranda Martínez, M. R., Delgadillo Martínez, J., & Alarcón, A. (2007). Degradación de fenantreno por microorganismos en la rizósfera del pasto alemán. *Terra Latinoamericana*, 25 (1), 25–33.
- Mishra, J., Prakash, J., & Arora, N. K. (2017). Role of Beneficial Soil Microbes in Sustainable Agriculture and Environmental Management. *Climate Change and Environmental Sustainability*, 4(2), 137.
- Molina, I. A. (2012). *Metodología para la determinación de plaguicidas bencimidazoles en vinos*. Universidad de Cuyo.
- Molina Romero, D., Bustillos Cristales, M. R., Rodríguez Andrade, O., Morales Garcia, E. Y., Santiago Saenz, Y., Castañeda Lucio, M., & Muñoz Rojas, J. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias , aislamientos en América y potencial biotecnológico. *BIOLOGICAS*, 17(February 2016), 24–34.
- Ndayambaje, B., Amuguni, H., Co, J., & Sibomwa, N. (2019). Pesticide Application Practices and Knowledge among Small-Scale Local Rice Growers and Communities in Rwanda : A Cross-Sectional Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 11.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 1–16.

- Paisio C., González P., Talano A., A. E. (2012). Remediación biológica de mercurio: Recientes avances. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 3(2), 119–146.
- Paixão, D. A., Dimitrov, M. R., Pereira, R. M., Accorsini, F. ., Vidotti, M. B., & Lemos, E. G. (2010). Molecular analysis of the bacterial diversity in a specialized consortium for diesel oil degradation. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34(1), 773–781.
- Pazos rojas, L. A., Marín cevada, V., García morales, Y., Baez, A., Villalobos lópez, M. A., Pérez santos, M., & Muñoz Rojas, J. (2016). Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(7), 72–85.
- Peeples JL. (1974). Microbial activity in benomyl-treated soil. *Phytopathology*, 64, 857–860.
- Peralta-Perez, M. D., & Volke-Sepulveda, T. L. (2012). the Antioxidant Defense in Plants: a Key Tool for Phytoremediation. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica*, 11(1), 75–88.
- Pérez y Terrón, R., Gonzalez Montfort, T. S., & Muñoz Rojas, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(3), 53–60.
- Perruchon, C., Chatzinotas, A., Omirou, M., Sotirios, V., Menkrissoglou Spiroudi, U., & G. Karpouzas, D. (2017). Isolation of a bacterial consortium able to degrade the fungicide thiabendazole: the key role of a *Sphingomonas* phylotype. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 12.
- Pincay Verdezoto, A. K. (2014). Caracterización y evaluación de bacterias *Pseudomonas* sp. solubilizadoras de fósforo, presentes en la rizósfera del maíz (*Zea mays* L) de los ensayos experimentales de iniap de las provincias de Imbabura, Bolivar, Chimborazo y Pichincha. *INIAP, Estación Experimental Santa Catalina*, (12).



- Puerta García, A., & Mateos Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3426–3431.
- Rahaman, M. M., Islam, K. S., & Jahan, M. (2018). Rice Farmers ' Knowledge of the Risks of Pesticide Use in Bangladesh. *Journal of Health y Pollution*, 8(20).
- Ríos, Yoania, Dibut, B. (2007). Gluconacetobacter diazotrophicus: Un microorganismo promisorio en la elaboración de biopreparados. *Cultivos Tropicales*, 28(4), 19–24.
- Rodríguez-Andrade O. (2009). *Estrés abiótico sobre bacterias benéficas*.
- Rodríguez Andrade, O., Bernal, P., Contreras Martínez, R., García Morales, Y. E., Molina Romero, D., Marín Cevada, V., ... Muñoz Rojas, J. (2018). Estrategias bacterianas para contrarrestar el estrés causado por frío y / o por congelación-descongelación y panorama de tolerancia de las rizobacterias . *Alianzas y Tendencias BUAP*, 10(July).
- Rodríguez Conde, S. (2011). *Potencial de las bacterias del suelo en la biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)*.
- Rodríguez, N. (2005). Residualidad (carryover) de herbicidas y mezclas. *Cosecha Gruesa*, 179–208.
- Rojas González, E. H. (2011). Concepto y estrategias de biorremediación, 1, 20–29.
- Sangchote S. (1989). Relationship between the physiological state of mangoes and the incidence of anthracnose (*Colletotrichum gloesporioides* penz.). *Food Journal*, 4(3), 123–124. <https://doi.org/10.13005/bbra/1776>
- Seo, J., Keum, Y., & Li, Q. X. (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6, 278–309.
- Siegel, M. (1975). Benomyl-soil microbial interactions. *Phytopathology*, 65, : 219-220.
- Suarez Beltran, M. (2013). *Guía de métodos de biorremediación para la*

*recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos.*

- Técher, D., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennisroune, A., Formanek, P., Martinez-Chois, C., ... Falla, J. (2011). Contribution of Miscanthus x giganteus root exudates to the biostimulation of PAH degradation: An in vitro. *Science of The Total Environment*, 409(20), 4489–4495.
- Tirado Torres, D., Avecedo Sandoval, O., Romero Gómez, C., Marmolejo Santillán, Y., & Gayosso Canales, M. (2015). Participación de consorcios microbianos en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(3), 77–86.
- Tripathi, S. N. S. • R. D. (2007). *Enviromental bioremediation technologies*.
- Verdú, G. (1971). Acción fungitóxica «in vitro» del benomilo, triforina y thiocur. *Bol. San. Veg. Plagas*, 17, 347-353.
- Vidali, M. (2001). Bioremediation . An overview \*. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163–1172.