



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**“Producción y aplicación de un biosurfactante producido por el  
consorcio microbiano para la biorremediación de suelos agrícolas  
contaminados con endosulfán”**

**Tesis que presenta:**

M.C. Anbu Landa Faz

**Para obtener el grado de:**

Doctor en Ciencias

**En la especialidad de**

Biotecnología

**Directores de Tesis:**

Dra. Refugio Rodríguez Vázquez (CINVESTAV)

Dra. Teresa Guadalupe Roldán Carrillo (IMP)

**Comité tutorial:**

Dra. Ma. Eugenia Hidalgo Lara (Biotecnología-CINVESTAV)

Dr. Ricardo Aguilar López (Biotecnología-CINVESTAV)

Dr. Mariano Enrique Cebrián García (Toxicología-CINVESTAV)

Dra. Sara González Orenge (COMAV, UPV)

## Agradecimientos

El doctorado la catarsis de mi vida; si volteó a enero de 2017 a ver a la Anbu que era en ese entonces no soy capaz de ver nada de ella hoy en día; estos años lloré y me desesperé como nunca, mis planes de vida cambiaron al 100% y personas con las que pensé que siempre estaría se fueron; todo esto me hizo re comenzar conocerme y llenar mi vida de nuevas personas y pensamientos; así que lo primero que quiero es agradecerle a Dios por poner el doctorado y el CINVESTAV en mi camino; llenarme de salud, vida y sustento para poder llevar a cabo este camino.

A mis padres que han aguantado mi estrés, mi llanto, mis ya no quiero, ya no puedo, ahora voy a cruzar el charco y ya no quiero regresar, etcétera; y nunca soltarme la mano, gracias porque fueron han sido los mejores papás que la vida me pudo haber dado. Gracias, papá por ser mi super héroe e inspirarme cada día. Gracias, mamá por siempre cuidarme y mandarme comida para que no muriera de hambre en el lab.

A premita de luz, por poner sus patitas de la buena suerte para que aceptaran el artículo; por llegar a iluminar mi vida y acompañarme en cada momento, por quedarse dormida en mis piernas como ahorita mientras escribía, para llenarme de inspiración y paz, por ser un espejo de luz que me ayuda a ser mejor persona cada día.

A la Ciris y abue Bulmaro porque sé que desde el cielo guían mis pasos y me cuidan; por enseñarme lo que es amor y que la vida no es solo estudio.

A las personas que se fueron en este proceso gracias por el tiempo que duraron en él y me apoyaron, gracias por irse y permitirme avanzar; siempre estarán en mi corazón.

A mis compañeros de doctorado Adry y Netza; gracias totales por escucharme, aconsejarme, ayudarme más de una vez con galáctico, transmitirme sus conocimientos siempre de una forma tan paciente y amable; gracias por dedicarme sus tardes y sus fines de semana; hicieron este proceso mucho más ligero.

A la Dra. Martha Castañeda por cada uno de sus consejos de maldad, por mandarme a leer papers, a decirme que no hiciera presentaciones rosas, por darme una dosis de realidad al estilo que solo ella sabe, y ayudarme a echar a andar el cromatógrafo, sin su ayuda no hubiera habido datos de plaguicidas.

A José Manuel, gracias porque tu alma reencontró a la mía para guiarla por el camino que necesitaba; fuiste una pieza clave para que yo pueda estar aquí escribiendo estos párrafos, gracias por enseñarme desde espiritualidad hasta biología molecular; por confiar en mí cuando yo deje de hacerlo; por ser ese apoyo que no me dejó desertar ya sea aquí o a 10,000 km. Te quiero infinitamente.

A los bebés Alfredo, Mine, Cory e Itzel gracias por colaborar en la enseñanza del universo a tener paciencia, así como todas sus aportaciones a la presente investigación.

A la M.C Nayeli Escobar, encontrarte en este camino fue una cosa chula de bonita, eres de mis amistades más sinceras y ñoñas; gracias por ayudarme a crecer, a mostrarme mis errores, por presentarme dates y por ser mi cómplice tanto de este lado como del otro lado del charco; es un enorme placer seguirte teniendo en mi vida y espero que esta amistad perdure por muchos años más; te quiero.

A la Dra. Brenda Xoconostle, gracias por hacerme sentir que no era un bicho raro al amar mi lado artístico igual que el académico; por prestarme tus telas para sacar mi estrés y sobre todo por dejarme conocerte y compartir esta pasión conmigo.

A mi familia latino-europea gracias porque estuve 10,000 km alejada de mi casa y ni un solo momento me sentí sola, gracias por presentarme a “Anbu española”, por ayudarme a cumplir mis sueños, por hacer una llegada al 3° piso épica, por confirmarme lo que espero de un grupo de trabajo, pero sobre todo por ser ese grupo de trabajo de ensueño; os quiero chicos, espero coincidamos nuevamente en la vida, la gira por Latinoamérica está pendiente.

A la mia sorella italiana Ilaria porque desde 2010 que aprendí italiano, mi sueño era pasar un fin de año en Italia y ustedes me recibieron como un miembro más de su familia muchísimas gracias por ser mi hermana y mi team de laboratorio, te quiero.

A la Dra. Sara González Orenge por todo el tiempo y cariño para explicarme desde cómo era la vida española hasta como hacer cada una de las metodologías de plantas; espero algún día regresar a Valencia para celebrar nuestros doctorados.

A las patas de mi mesa (Sara y Esteph) gracias porque siempre estuvieron ahí, porque 1000 veces me escucharon decir no puedo e hicieron todo para levantarme el ánimo y demostrarme que podía; gracias porque a lo largo de los años nuestra amistad se ha afianzado más y nos hemos vuelto una familia; las amito.

A mi familia aérea, gracias porque ustedes hacían que mis problemas se quedaran afuera del salón de telas y llegará con energía 1000 al lab, gracias porque cada una de ustedes me ha enseñado a ser una mejor persona y a confiar en mí; agradezco infinitamente al universo que las haya cruzado en mi camino, las quiero muchísimo

A Viridiana Baltazar creo que cualquier palabra se va a quedar corta para agradecerle lo mucho que has hecho por mí, gracias por enseñarme a amarme y a encontrar mi luz, gracias por ayudarme a hacer las paces con mi pasado para desbloquear mi presente, gracias por enseñarme que todo es un espejo y cómo afrontar cada situación que se ha presentado, pero sobre todo gracias por tu amistad, te quiero muchísimo.

A la Dra. Refugio Rodríguez por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme todo lo necesario para poder desarrollar este proyecto, gracias por todas las desveladas para que quedarán los artículos y también por cada enseñanza que me ha dado, no sabe cuánto he aprendido de usted tanto académica como personalmente.

A la Dra. Tere Roldán, a veces siento que fue ayer cuando en 2010 llegó una niña despistada al IMP buscando donde hace su servicio social y hoy estoy aquí escribiendo los agradecimientos de mi tesis doctoral, no sabe cuánto le agradezco cada palabra que he recibido de usted desde el primer momento que la conocí, cada consejo y enseñanza, sobre todo por enseñarme a amar el lab y confirmarme que este es el camino que quiero seguir, creo que si nunca la hubiera conocido no hubiese querido hacer un doctorado, muchas gracias por ser la asesora que es.

A la Dra. Ma. Eugenia Hidalgo, he de confesar que cuando la dra. Refugio me sugirió ponerla en mi comité tutorial me moría de miedo, pero ha sido muy grato convivir con usted, siempre me ha dado una palabra de aliento, así como consejos sumamente útiles para ver las cosas desde un lado más biológico y menos químico, espero llegar a ser tan buena como usted.

Al Dr. Ricardo Aguilar muchas gracias por cada uno de sus comentarios en cada examen tutorial, siempre me hacían exigirme más y por lo tanto crecer, espero algún día poder ser tan buena como usted.

Al Dr. Fernando Esparza por compartirme su experiencia, darme una sonrisa y ánimos en cada examen tutorial.

Al Dr. Mariano Cebrián porque desde el primer momento que llegue a su cubículo, fue demasiado amable y accesible conmigo; en cada examen aportó un lado que yo desconocía y eso me hizo poder crecer más.

A los Drs. Oscar Maena y Mónica Boscaiu por recibir a una desconocida del otro lado del mundo en su laboratorio, por donar su beca para hacer posible el artículo de Agronomy, por quitarme toda la ignorancia de la parte agronómica y hacerme sentir apapachada los 6 meses que pase con ustedes; espero que algún día volvamos a coincidir, fue un enorme placer trabajar a su lado.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización del doctorado.

## Índice

1. Introducción.....	16
1.1 Plaguicidas.....	20
1.2 Plaguicidas organoclorados .....	21
1.3 Endosulfán .....	22
1.4 Biorremediación .....	24
1.5 Uso de los biosurfactantes en la biorremediación .....	25
1.6 Fuente de carbono en la producción de BS.....	27
1.7 Fuente de nitrógeno en la producción de BS.....	28
1.8 Bioaumentación como tratamiento de biorremediación.....	28
1.9 Estrés fisiológico en vegetales .....	29
2. Antecedentes .....	31
2.1 Antecedentes del uso de BS en tratamientos de biorremediación.....	31
2.2 Antecedentes de la bioaumentación como tratamiento de BR en suelos contaminados con endosulfán.....	33
2.3 Estrés abiótico en cultivos por salinidad y agroquímicos. ....	34
2.4 Antecedentes del grupo de investigación .....	37
3. Justificación.....	38
4. Hipótesis.....	39
5. Objetivos.....	39
5.1 Objetivo general.....	39
5.2 Objetivos específicos.....	39
6. Estrategia experimental .....	41
7. Metodología.....	44
7.1 Obtención del microorganismo.....	44
7.1.1 Identificación del microorganismo .....	45
7.2 Procesamiento de la muestra .....	46
7.3 Evaluación de la producción de biosurfactante .....	46
7.3.1 Tensión superficial .....	46
7.3.2 Actividad emulsificante .....	46
7.3.3 Dilución micelar crítica .....	47
7.4 Evaluación del crecimiento.....	47
7.4.1 Cuantificación de biomasa.....	47

7.4.2 Azúcares reductores .....	47
7.5 Selección de las condiciones del medio de cultivo para la producción de BS.....	48
7.6 Purificación parcial del BS.....	49
7.6.1 Purificación con acetona.....	49
7.6.2 Extracción con hexano y acetato de etilo .....	50
7.6.3 Precipitación ácida seguida de extracción con cloroformo y etanol. ....	50
7.7 Estabilidad del biosurfactante.....	50
7.7.1 Estabilidad al pH .....	50
7.7.2 Estabilidad a la salinidad .....	51
7.7.3 Estabilidad a la temperatura .....	51
7.8 Caracterización del BS .....	51
7.8.1. Carbohidratos totales.....	51
7.8.2. Lípidos.....	52
7.8.3. Proteínas.....	52
7.8.4. Determinación de la naturaleza iónica del surfactante .....	52
7.8.5. Espectrometría de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR) .....	53
7.9 Evaluación de la capacidad antimicrobiana del BS .....	53
7.9.1 Aplicación del BS en un suelo contaminado con <i>E. coli</i> .....	53
7.10 Caracterización fisicoquímica del suelo a utilizar .....	54
7.10.1 Preparación del suelo .....	54
7.10.2 Determinación de pH y conductividad.....	54
7.10.3 Cuantificación de carbono y materia orgánica .....	55
7.10.4 Cuantificación de nitrógeno total .....	55
7.10.5 Determinación de fósforo soluble .....	56
7.11 Preparación del suelo artificial .....	56
7.12 Determinación de plaguicidas en suelo .....	57
7.13 Selección del cultivo agrícola a utilizar .....	58
7.14 Determinación de plaguicidas en plántulas .....	58
7.15 Determinación de plaguicidas organoclorados en vegetales desarrollados en Xochimilco.....	58
7.16 Diseños de experimentos propuestos para el proceso de biorremediación .....	59
7.17 Fitotoxicidad en plantas germinadas en suelo biorremediado .....	60
7.18 Preparación de los sistemas para evaluación de estrés abiótico.....	61

7.19	Medición de parámetros de crecimiento .....	61
7.20	Parámetros de crecimiento finales .....	61
7.21	Conservación de material fresco para análisis posteriores .....	62
7.22	Cuantificación de pigmentos fotosintéticos .....	62
7.23	Cuantificación de iones (Na <sup>+</sup> , Ca <sup>+2</sup> , K <sup>+</sup> y Cl <sup>-</sup> ).....	63
7.24	Cuantificación de osmolitos (prolina y azúcares).....	63
7.24.1	Cuantificación de prolina.....	63
7.24.2	Preparación de extracto para MDA, compuestos fenólicos, flavonoides y azúcares.....	64
7.24.3	Cuantificación de azúcares .....	64
7.25	Cuantificación de marcadores de estrés oxidativo (MDA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	64
7.25.1	Cuantificación de malondialdehído (MDA).....	64
7.25.2	Cuantificación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	65
7.26	Antioxidantes no enzimáticos .....	66
7.26.1	Cuantificación de compuestos fenólicos.....	66
7.26.2	Cuantificación de flavonoides.....	66
7.27	Antioxidantes enzimáticos .....	66
7.27.1	Preparación del extracto .....	66
7.27.2	Cuantificación de proteínas.....	67
7.27.3	Cuantificación de superóxido dismutasa (SOD) .....	67
7.27.4	Cuantificación de catalasas.....	68
7.27.5	Cuantificación de ascorbato peroxidasa .....	68
7.27.6	Cuantificación de glutatión reductasa .....	68
8.	Resultados y discusión .....	70
FASE I.....		70
8.1	Caracterización del consorcio microbiano .....	70
8.2	Evaluación preliminar de la producción de BS.....	74
8.3	Evaluación de diferentes parámetros sobre las características de TS y E <sub>24</sub> .....	77
8.4	Cinética de crecimiento y determinación de TS y E <sub>24</sub> .....	83
8.5	Purificación parcial del biosurfactante.....	84
8.6	Estabilidad del extracto a diferentes condiciones .....	85
8.7	Caracterización del extracto .....	87
8.7.1	Composición del producto.....	87

8.7.2 Análisis infrarrojo .....	89
8.8 Evaluación de la actividad emulsificante con diferentes aceites .....	89
8.9 Actividad antimicrobiana del BS.....	90
8.9.1 Caracterización de las cepas a utilizar.....	91
8.9.2 Inhibición bacteriana.....	92
8.9.2.1 Aplicación del BS a un suelo contaminado con <i>E.coli</i> .....	94
FASE II.....	95
8.10 Caracterización fisicoquímica del suelo a utilizar .....	95
8.11 Isotermas de adsorción .....	97
8.12 Fitotoxicidad del endosulfán en cultivos.....	98
8.12.1 Fitotoxicidad en el cultivo de frijol.....	99
8.12.2 Fitotoxicidad en el cultivo de chícharo .....	101
8.12.3 Fitotoxicidad en el cultivo de coliflor.....	102
8.12.4 Fitotoxicidad en el cultivo de lechuga italiana.....	104
8.13 Determinación de plaguicidas organoclorados en una chinampa tradicional .....	106
8.14 Evolución de los diferentes tratamientos en la degradación de endosulfán .....	109
8.15 Evaluación de la producción de biosurfactante <i>In situ</i> .....	113
8.16 Fitotoxicidad en frijoles germinados en suelo tratado simultáneamente .....	115
8.17 Fitotoxicidad en frijoles germinados en suelo biorremediado previamente .....	118
8.18 Caracterización fisicoquímica final del suelo biorremediado .....	121
8.19 Respuestas a estrés abiótico del material seco cultivado en el lab 44 de compuestos Xenobióticos del CINVESTAV Zacatenco .....	123
8.19.1 Cuantificación de iones .....	123
8.19.2 Cuantificación de osmolitos .....	124
8.19.2.1 Cuantificación de prolina .....	124
8.19.2.2 Cuantificación de azúcares .....	126
8.19.3 Cuantificación de antioxidantes no enzimáticos.....	127
8.19.3.1 Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides .....	127
8.20 Respuestas a estrés abiótico en material fresco .....	129
8.20.1 Índice de germinación .....	129
8.20.2 Evolución de los parámetros de crecimiento en los diferentes cultivos .....	130
8.20.3 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos en los diferentes sistemas .....	137
8.20.4 Evaluación del estrés salino en los diferentes sistemas mediante la evaluación de iones.....	139

8.20.5 Evaluación de osmolitos en los diferentes sistemas .....	141
8.20.5.1 Cuantificación de prolina .....	141
8.20.5.2 Cuantificación de azúcares .....	142
8.20.6 Evaluación de marcadores de estrés en los diferentes sistemas .....	143
8.20.6.1 Cuantificación de malondialdehído .....	144
8.20.6.2 Cuantificación de peróxido de hidrogeno.....	145
8.20.7 Evaluación de antioxidantes no enzimáticos .....	146
8.20.7.1 Cuantificación de compuestos fenólicos .....	146
8.20.7.2 Cuantificación de flavonoides.....	147
8.20.8 Evaluación de antioxidantes enzimáticos .....	148
8.20.8.1 Cuantificación de proteínas.....	149
8.20.8.2 Cuantificación de superóxido dismutasa (SOD) .....	150
8.20.8.3 Cuantificación de catalasas.....	151
8.20.8.4 Cuantificación de ascorbato peroxidasa .....	152
8.20.8.5 Cuantificación de glutatión reductasa .....	153
9. Conclusiones.....	154
10. Bibliografía.....	159
11. Perspectivas a futuro.....	175

## Índice de tablas

<b>Tabla 2.1</b> Hongos productores de biosurfactantes .....	31
<b>Tabla 2.2</b> Microorganismos productores de biosurfactantes usados en procesos de biorremediación .....	32
<b>Tabla 7.1</b> Medio de cultivo para la producción de biosurfactante.....	33
<b>Tabla 7.2</b> Diseño de experimentos Taguchi L9.....	37
<b>Tabla 7.3</b> Componentes del agar azul.....	52
<b>Tabla 8.1</b> Resultados del cambio en las propiedades de TS y E <sub>24</sub> , de los cultivos establecidos en el diseño de experimentos Taguchi L9.....	63
<b>Tabla 8.2</b> Análisis de varianza para la actividad emulsificante.....	65
<b>Tabla 8.3</b> Análisis de varianza para la diferencial de la tensión superficial ( $\Delta$ TS).....	66
<b>Tabla 8.4</b> Estabilidad de BS producidos por diferentes microorganismos .....	86

<b>Tabla 8.5</b> Composición de BS producidos por diferentes microorganismos .....	88
<b>Tabla 8.6</b> Actividades emulsificantes ante diferentes aceites.....	90
<b>Tabla 8.7</b> Caracterización microscopia de <i>E. coli</i> y <i>P. putida</i> .....	91
<b>Tabla 8.8</b> Microorganismos productores de BS con actividad antimicrobiana .....	94
<b>Tabla 8.10</b> Caracterización fisicoquímica del suelo modelo .....	96
<b>Tabla 8.10</b> Parámetros cinéticos de las isotermas de adsorción .....	98
<b>Tabla 8.11</b> Fitotoxicidad en planta de frijol.....	99
<b>Tabla 8.12</b> Fitotoxicidad en la planta de chícharo.....	101
<b>Tabla 8. 13</b> Pruebas de fitotoxicidad en la planta de coliflor.....	103
<b>Tabla 8.14</b> Pruebas de fitotoxicidad en la planta de lechuga italiana.....	105
<b>Tabla 8.15</b> Determinación de organoclorados en vegetales del productor 1 .....	107
<b>Tabla 8.16</b> Determinación de plaguicidas organoclorados en vegetales del productor 2	108
<b>Tabla 8.17</b> Evaluación indirecta de la producción de BS In situ.....	114
<b>Tabla 8.18</b> Pruebas de fitotoxicidad en plantas de frijol germinadas en suelo con tratamiento de BR simultáneamente. ....	115
<b>Tabla 8.19</b> Pruebas de fitotoxicidad en plantas de frijol germinadas en suelo BR previamente.....	119
<b>Tabla 8.20</b> Propiedades fisicoquímicas de los suelos tratados.....	121

## Índice de figuras

<b>Fig. 1.1</b> Isómeros del endosulfán.....	22
<b>Fig. 1.2</b> Ruta de degradación del endosulfán.....	23
<b>Fig. 8.1</b> Hongo AL-L44 aislado y cultivado en PDA proveniente del residual cítrico. A) PDA con rosa de Bengala. B) PDA.....	62
<b>Fig. 8.2</b> Evaluación del crecimiento radial del hongo AL-L44 cultivado en PDA, durante 10 días a diferentes temperaturas.....	63
<b>Fig. 8.3</b> Microcultivo realizado al hongo AL-L44 aislado del residual cítrico, observación en microscopio óptico a 100X. ....	72
<b>Fig. 8.4</b> Morfología característica del grupo <i>Penicillium</i> .....	72
<b>Fig. 8.5</b> Dendograma filogenético del microorganismo aislado .....	73
<b>Fig. 8.6</b> Reducción de la tensión superficial por <i>P. crustosum</i> utilizando un medio mineral con un residual cítrico como fuente de carbono; cultivado a 30 °C y 120 rpm.....	75
<b>Fig. 8.7</b> Presencia de actividad emulsificante por <i>P. crustosum</i> utilizando un medio mineral con un residual cítrico como fuente de carbono, cultivado a 30 °C y 120 rpm.....	75

<b>Fig. 8.8</b> Observación microscópica con tinción de Gram a 100X, del cultivo en medio mineral con un residual cítrico como sustrato, a las 96 horas de cultivo .....	76
<b>Fig. 8.9</b> Análisis confirmativo de la producción de BS por <i>P. crustosum</i> AL-L44 utilizando un medio mineral con un sustrato cítrico como fuente de carbono cultivado a 30 °C y 120 rpm. ....	77
<b>Fig. 8.10</b> Efecto de las variables independientes sobre la actividad emulsificante.....	80
<b>Fig. 8.11</b> Gráfico de residuales para la actividad emulsificante.....	81
<b>Fig. 8.12</b> Efecto de las variables independientes sobre la $\Delta$ T.S.....	82
<b>Fig. 8.13</b> Gráfico de residuales para el diferencial de tensión superficial .....	83
<b>Fig. 8.14</b> Evaluación del crecimiento y producción de BS por <i>P. crustosum</i> AL-L44 con glucosa como sustrato, $\text{NH}_4\text{NO}_3$ como fuente de nitrógeno, a 120 rpm y pH inicial de 5. 84	
<b>Fig. 8.15</b> Estabilidad del BS producido por <i>P. crustosum</i> AL-L44 sometido a diferentes condiciones de A) pH, B) Temperaturas, C) Salinidad.....	86
<b>Fig. 8.16</b> <i>Penicillium crustosum</i> AL-L44 cultivado en agar azul .....	87
<b>Fig. 8.17</b> Análisis infrarojo del BS producido por <i>Penicillium crustosum</i> AL-L44. ....	89
<b>Fig. 8.18</b> Caracterización macroscópica de los microorganismos utilizados a) <i>E. coli</i> en agar EMB, b) Observación microscópica con tinción de Gram a 100X para <i>E. coli</i> ; c) <i>P. putida</i> en agar cetrimida expuesta a luz UV; d) Observación microscópica con tinción de Gram a 100X para <i>P. putida</i> .....	92
<b>Fig. 8.19</b> Inhibición en el desarrollo de a) <i>E. coli</i> y b) <i>P. putida</i> .....	93
<b>Fig. 8.20</b> Inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i> al adicionar BS.....	95
<b>Fig. 8.21</b> Isotermas de adsorción de a) Langmuir, b) Freundlich .....	98
<b>Fig. 8.22</b> Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en el cultivo de frijol. ....	100
<b>Fig. 8.23</b> Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en el cultivo de chícharo. ....	102
<b>Fig. 8.24</b> Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en cultivo de coliflor .....	104
<b>Fig. 8. 25</b> Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en cultivo de lechuga.....	105
<b>Fig. 8. 26</b> Evolución del endosulfán $\alpha$ en los diferentes tratamientos de biorremediación. ....	110
<b>Fig. 8.27</b> Evolución del endosulfán $\beta$ en los diferentes tratamientos de biorremediación. ....	110
<b>Fig. 8.28</b> Evolución del sulfato endosulfán en los diferentes tratamientos de biorremediación .....	111
<b>Fig.8.29</b> Evolución del endosulfán alcohol en los diferentes tratamientos de biorremediación .....	111

<b>Fig.8.30</b> Evolución del endosulfán lactona en los diferentes tratamientos de biorremediación .....	112
<b>Fig. 8.31</b> Evolución del endosulfán éter en los diferentes tratamientos de biorremediación .....	112
<b>Fig. 8.32</b> Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en cultivo de frijol germinado durante la biorremediación con <i>P. crustosum</i> .....	116
<b>Fig. 8.33</b> Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en cultivo de frijol germinado en durante la biorremediación con inóculo CMCN .....	116
<b>Fig. 8.34</b> Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en suelos biorremediados y germinados .....	118
<b>Fig. 8.35</b> Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en cultivo de frijol germinado en suelo biorremediado con inóculo CMCN. ....	120
<b>Fig. 8.36</b> Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en cultivo de frijol germinado en suelo biorremediado con <i>P. crustosum</i> .....	120
<b>Fig. 8.37</b> Cuantificación de iones mono y divalentes relacionados con la salinidad en hojas y tallo de cultivo seco de <i>P. leptostachyus</i> cultivado CINESTAV, Zacatenco en invernadero a condiciones ambientales. ....	124
<b>Fig. 8.38</b> Cuantificación de prolina en hojas secas de <i>P.leptostachyus</i> cultivado en CINESTAV, Zacatenco en invernadero a condiciones ambientales. ....	125
<b>Fig. 8.39</b> Cuantificación de azúcares en hojas secas de <i>P. leptostachyus</i> cultivado CINESTAV, Zacatenco en invernadero a condiciones ambientales.....	127
<b>Fig. 8.40</b> Cuantificación de compuestos fenólicos en hojas secas de <i>P. leptostachyus</i> cultivado CINESTAV, Zacatenco en invernadero a condiciones ambientales.. ....	128
<b>Fig. 8.41</b> Cuantificación de flavonoides en hojas secas de <i>P. leptostachyus</i> cultivado CINESTAV, Zacatenco en invernadero a condiciones ambientales.....	128
<b>Fig. 8.42</b> Índice de germinación de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad.....	130
<b>Fig. 8.43</b> Evolución de la parte aérea del cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad....	132
<b>Fig. 8.44</b> Evolución del diámetro de tallo del cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad.....	132

<b>Fig. 8.45</b> Evolución del número de hojas del cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad.....	133
<b>Fig. 8.46</b> Longitud de raíz al cabo de 30 días en cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad.....	134
<b>Fig. 8.47</b> Pesos frescos en cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad.. .....	135
<b>Fig. 8.48</b> Pesos secos en cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad.....	136
<b>Fig. 8.49</b> % Humedad total en cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad.. .....	136
<b>Fig. 8.50</b> Cuantificación de clorofila $\alpha$ en cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad....	138
<b>Fig. 8.51</b> Cuantificación de clorofila $\beta$ en cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad....	138
<b>Fig. 8.52</b> Cuantificación de carotenoides en cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad.....	139
<b>Fig. 8.53</b> Cuantificación de iones mono y divalentes relacionados con la salinidad en raíces, hojas y tallo de cultivo cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad. ....	140
<b>Fig. 8.54</b> Cuantificación de prolina en cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad....	142
<b>Fig. 8.55</b> Cuantificación de azúcares en cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad....	143
<b>Fig. 8.56</b> Cuantificación de MDA en cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad....	144
<b>Fig. 8.57</b> Cuantificación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad....	145
<b>Fig. 8.58</b> Cuantificación de compuestos fenólicos en cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad.....	147

<b>Fig. 8.59</b> Cuantificación de flavonoides en cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad. ....	148
<b>Fig. 8.60</b> Cuantificación de proteínas en cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad....	149
<b>Fig. 8.61</b> Actividad del SOD por cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad. ....	150
<b>Fig. 8.62</b> Actividad del ascorbato peroxidasa por cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad. ....	151
<b>Fig. 8.63</b> Actividad del ascorbato peroxidasa por cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad. ....	152
<b>Fig. 8.64</b> Actividad del glutatión reductasa por cultivo de <i>P. leptostachyus</i> cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad. ....	153

### Índice de ecuaciones

Ec.1 .....	47
Ec. 2 .....	54
Ec. 3 .....	55
Ec. 4 .....	55
Ec. 5 .....	55
Ec. 6 .....	56
Ec.7 .....	62
Ec. 8 .....	62
Ec.9 .....	62
Ec. 10 .....	65
Ec.11 .....	65
Ec. 12 .....	65

## Nomenclatura

LD<sub>50</sub>- Dosis letal que causa la muerte del 50% de un grupo de estudio.

TS- Tensión superficial.

TI- Tensión interfacial.

E<sub>24</sub>%- Actividad emulsificante a las 24 h.

BS- Biosurfactante.

PC- *Penicillium crustosum*.

CMC- Concentración micelar crítica.

DMC- Dilución micelar crítica.

CMCN- Consorcio microbiano utilizado para el proceso de biorremediación desarrollado por el grupo de trabajo.

BR- Biorremediación.

IG- Índice de germinación.

Chl  $\alpha$  y  $\beta$ : Clorofila  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente.

MDA- Malondialdehído.

SOD- Superóxido dismutasa.

CAT- Catalasas.

APX- Ascorbato peroxidasa.

GR- Glutación reductasa.

## Resumen

Esta investigación evaluó la aplicación de un consorcio microbiano desarrollado en cáscara de naranja (CMCN); así como un microorganismo aislado del mismo (*P. crustosum*) para el mejoramiento de suelos salinos contaminados con endosulfán.

Ambos inóculos presentaron la capacidad de producir biosurfactante (BS) presentando actividad tensoactiva y emulsificante; las cuales fueron maximizadas mediante un diseño de experimentos Taguchi L9 encontrando que las mejores condiciones de cultivo consistían en glucosa como fuente de Carbono,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  como fuente de Nitrógeno, pH inicial de 5 y 120 rpm; bajo estas condiciones se obtuvo un producto semi purificado con un  $\Delta\text{TS}$  de 33 mN/m y una  $E_{24}$  de 71.43 %; compuesto por 3.13 % carbohidratos, 76 % lípidos y 20.87 % proteínas. La actividad tensoactiva fue estable a 80°C, pH de 2 a 12 y salinidad de 20% w/w, mientras que la emulsificante a 80°C, pH de 8 a 12.

La actividad antimicrobiana del bioproducto fue evaluada ante *E. coli* y *P. putida* encontrándose un 100 % de inhibición usando agar con BS como fuente de carbono / Agar nutritivo: BS (1:1). El BS también se adicionó a un suelo proveniente de la zona chinampera con una concentración inicial de 25,000 UFC de *E. coli* inhibiéndose en un 99.79 % la actividad del microorganismo al 8° día y del 100 % al 12° día.

Los inóculos CMCN y *P. crustosum* (PC) fueron adicionados a un suelo altamente salino, con alto contenido de materia orgánica y arcilla; encontrando una tasa de remoción del 92.93 % a los 30 días con PC, sin embargo, este sistema mostro 0.19 mg /kg de sulfato endosulfán residual, por su parte el sistema con el inóculo CMCN tuvo 0.08 mg/kg de sulfato endosulfán con una tasa de remoción del 85.5% al cabo de 2 meses. La producción de BS *In situ* demostró que ambos inóculos tenían la capacidad de segregar este metabolito teniendo actividad tensoactiva y emulsificante, sin embargo, estos valores fueron menores que en medio líquido alcanzando un máximo de  $\Delta\text{TS}$  de 16.77 mN/m después de la purificación.

Plantas de *Phaseolus leptostachyus* fueron seleccionadas como cultivo modelo para la evaluación de toxicidad, por su capacidad para adsorber endosulfán y su rápido desarrollo, encontrando un menor índice de germinación y longitud de raíz en los cultivos desarrollados

en el suelo con endosulfán; sin embargo, en este sistema también se encontraron el mayor número de hojas y tamaño de parte aérea comportamiento asociado a un mecanismo de defensa del vegetal (volatilización).

Las plantas desarrolladas en los sistemas controles bioaumentados con los inóculos CMCN y PC mostraron las mejores condiciones morfológicas (tamaño de parte aérea, número de hojas, peso fresco y secos); así como las mayores concentraciones de clorofila  $\alpha$ ,  $\beta$  y carotenoides junto con el sistema BR PC. Estos sistemas también presentaron las menores concentraciones de iones y prolina, parámetros asociados a un mejor desarrollo del cultivo.

Por otro lado, los sistemas que fueron tratados con el inóculo CMCN mostraron las concentraciones de  $H_2O_2$  más bajas, lo que representó menores concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides; en el sistema control con el inóculo CMCN se encontró la menor concentración de azúcares y en el sistema BR CMCN la menor concentración de MDA, parámetros también asociados al estrés en los cultivos.

Todos estos hallazgos, muestran la importancia de la bioaumentación a suelos salinos con contaminantes de naturaleza hidrofóbica.

## **Abstract**

This research evaluated the application of a microbial consortium developed in orange peel (CMCN); as well as a microorganism isolated from it (*P. crustosum*) for the improvement of a saline soil contaminated with endosulfan.

Both inocula had the ability to produce biosurfactant (BS) showing surfactant and emulsifying activity; which were maximized through a Taguchi L9 design of experiments, finding that the best culture conditions were glucose as carbon source,  $NH_4NO_3$  as nitrogen source, initial pH of 5 and 120 rpm; under these conditions, a semi-purified product was obtained with a  $\Delta ST$  of 33 mN/m and  $E_{24}$  of 71.43%; composed of 3.13% carbohydrates, 76% lipids and 20.87% proteins. The surfactant activity was stable at 80°C, pH from 2 to 12 and salinity of 20% w / w, while the emulsifier at 80 ° C, pH from 8 to 12.

The antimicrobial activity of the bioproduct was evaluated against *E. coli* and *P. putida*, finding 100% inhibition with agar and BS as carbon source and Nutritive agar: BS (1: 1). The BS was also added to a soil from the chinampera zone with an initial concentration of 25,000 CFU of *E. coli*, inhibiting the activity of the microorganism by 99.79% on the 8<sup>th</sup> day and 100% at the 12<sup>th</sup> day.

The CMCN and *P. crustosum* (PC) inocula were added to a highly saline soil, with a high content of organic matter and clay; finding a removal rate of 92.93% at 30 days with PC, however, this system showed 0.19 mg/kg of endosulfan sulfate, meanwhile the system with the CMCN inoculum had 0.08 mg/kg of endosulfan sulfate with a removal rate of 85.5% after 2 months. The BS *In situ* production was evaluated, showing that both inocula had the ability to produce this metabolite having surfactant and emulsifying activity, however, these values were lower than in liquid medium reaching a maximum  $\Delta$ ST 16.77 mN/m after purification.

*Phaseolus leptostachyus* plants were selected as a model crop for toxicity evaluation, due to their ability to adsorb endosulfan and their rapid development, finding a lower germination index and root length in the crops develop in the soil with endosulfan; however, in this system the highest number of leaves and size of aerial part were also found, behavior associated with a plant defense mechanism (volatilization).

The plants developed in the bio-augmented control systems with CMCN and PC inocula showed the best morphological conditions (size of aerial part, number of leaves, fresh and dry weight); as well as the highest concentrations of chlorophyll  $\alpha$ ,  $\beta$  and carotenoids together with the BR PC system. These systems also presented the lowest concentrations of ions and proline, parameters associated with better crop development.

On the other hand, the systems that were treated with CMCN inoculum showed the lowest H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, which represented lower concentrations of phenolic compounds and flavonoids; in the control system with the CMCN inoculum, the lowest concentration of sugars was found and in the BR CMCN system the lowest concentration of MDA, parameters also associated with stress in crops.

All these findings show the importance of bioaugmentation for bioremediation of saline soils with pollutants of a hydrophobic nature.

## **1. Introducción**

La zona agrícola de la Ciudad de México ha ido perdiendo productividad a través de los años; teniendo en 2018 un total de 1693 hectáreas cosechadas de 10,012 ha., lo que representa solamente un 17 % de su uso (Anuario estadístico de producción agrícola, 2019).

Este comportamiento ha sido reportado desde 2006, cuando se apreció una reducción de hasta un 85 % de la superficie productiva de la zona chinampera (Guevara-Olivar et al., 2015) debido a los problemas de baja fertilidad y alta salinidad en la zona.

La salinidad causa estrés fisiológico a los cultivos, el cual se ve reflejado en una reducción de la adsorción de nutrientes por las raíces, lo que afecta su capacidad agrícola y la calidad del producto final (Botella-Marrero, 2017).

Con la finalidad de solucionar esta problemática, los agricultores han optado por la utilización de diferentes agroquímicos; generando un problema mayor por la traslocación del xenobiótico y sus metabolitos secundarios al producto final, los cuales pueden ser dañinos para la salud de los diferentes seres vivo; además de, ocasionar estrés en los vegetales.

Entre los agroquímicos utilizados destacan los fertilizantes, fitorreguladores y los diversos plaguicidas, siendo estos últimos de los más tóxicos y persistentes en el medio ambiente.

### **1.1 Plaguicidas**

La FAO (Food and Agriculture Organization) define a los plaguicidas como: "Cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del

crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte”.

Estas sustancias cuentan con más de un tipo de clasificación por la SEMARNAT; ya que pueden ser clasificados de acuerdo a su naturaleza (química o sintética); a la plaga que ataquen (insecticidas, herbicidas, plaguicidas, fungicidas, molusquicidas, ovicidas, arácnidas y nematocidas); de acuerdo a su presentación (polvo, líquido, gas y comprimido); toxicidad (efectos a corto, mediano y largo plazo); su persistencia en el medio ambiente (no persistentes, moderadamente persistentes, persistentes y permanentes) o de acuerdo a su composición química (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, fenoles, dinitrofenoles, triazinas, otros); para términos de investigación esta última clasificación es la más utilizada.

## **1.2 Plaguicidas organoclorados**

Los plaguicidas organoclorados, son de los más persistentes en el medio ambiente, su tiempo promedio de degradación es de 5 años y esto se debe a que están conformados de estructuras muy estables. Entre los compuestos más persistentes destacan el toxafeno (11 años), el DDT y endrín (10 años), clordano (8 años), dieldrín (7 años), aldrín (5 años), heptacloro (4 años) y lindano (2 años) (Calva y Torres, 1998).

Los principales cultivos en los que son utilizados estos compuestos en México son: alfalfa, brócoli, chícharo, col, fresa, jitomate, lechuga, papa, nogal, pepino, maíz, caña, frutales, cítricos, arroz, frijol, trigo, chile y coco (COFEPRIS, 2016).

El contacto de los seres humanos con este tipo de compuestos puede causar lesiones cutáneas, daño neurotóxico, genotóxico, efectos carcinógenos y reproductivos (Leal et al., 2014).

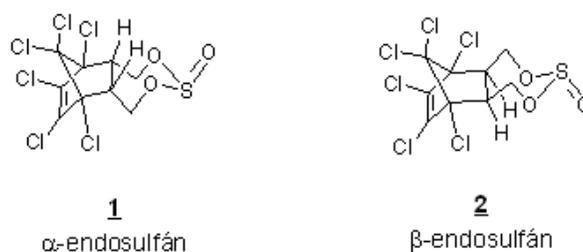
Estudios realizados en zonas prístinas como el Ártico y la Antártida han demostrado la presencia de plaguicidas organoclorados como el lindano y endosulfán tanto en agua como en el estómago de ciertos mamíferos pertenecientes a la región, lo que demuestra la

problemática que representa la persistencia y volatilidad de este tipo de compuestos (INE, 2011).

### 1.3 Endosulfán

En México se usan hasta 30 plaguicidas que han sido prohibidos o restringidos en otros países, entre estos destaca el endosulfán.

De manera comercial, el endosulfán se encuentra en sus dos isómeros ( $\alpha$  y  $\beta$ ) en una proporción de 7:3 (Fig. 1.1) con una pureza entre el 94 y 96 % dependiendo del proveedor (ECO, 1995).



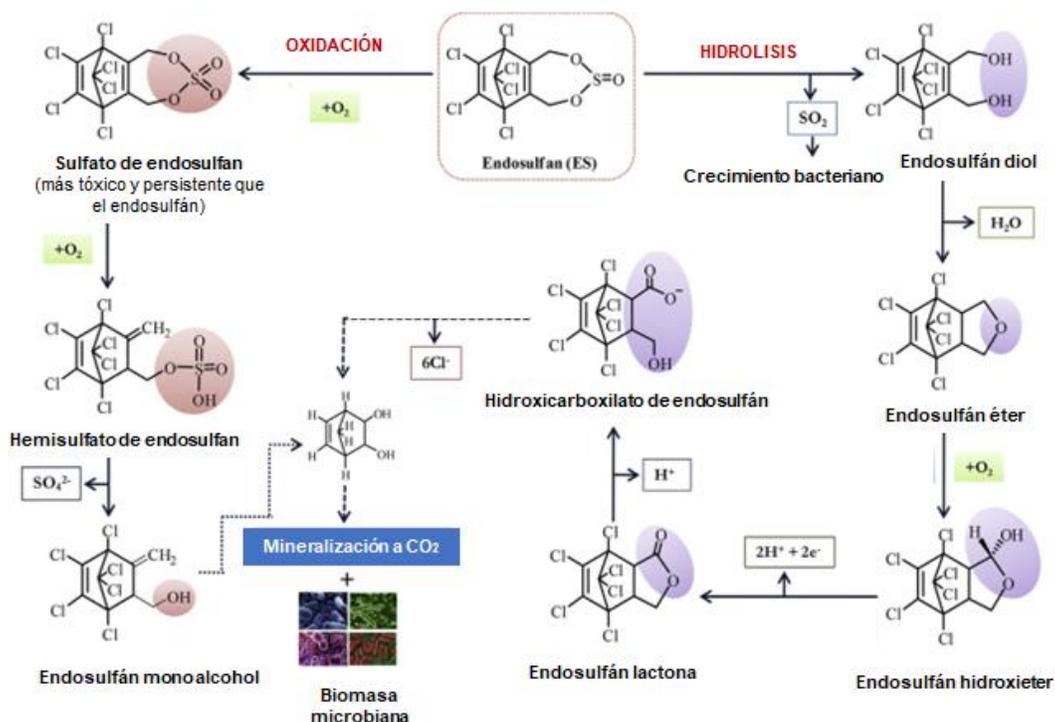
**Fig. 1.1** Isómeros del endosulfán

El endosulfán está prohibido en países como: Belice, Filipinas, Singapur, Colombia, Suecia, Nueva Zelanda, Canadá, Dinamarca, Finlandia, Holanda, Noruega, Venezuela y Yugoslavia, por ser un neurotóxico agudo para insectos y mamíferos incluyendo el ser humano (Arellano-Aguilar, 2016). Este compuesto es clasificado por la OMS como moderadamente tóxico y por la Conferencia Americana de Higienistas Industriales Gubernamentales (ACGIH por sus siglas en inglés) como A4 (no carcinogénico para humanos); lamentablemente no cuenta con clasificación ante la EPA y la IARC debido a la falta de datos sobre su potencial cancerígeno (National Institute of Health, 2015).

El isómero  $\alpha$  es ligeramente más tóxico con una LD<sub>50</sub> de 14 mg/kg, mientras que el  $\beta$  tiene una LD<sub>50</sub> de 17 mg/kg. Este compuesto tiene diferentes rutas de degradación dependiendo de los microorganismos presentes en el proceso de biorremediación (Fig. 1.2); su principal metabolito secundario (sulfato de endosulfán) tiene una LD<sub>50</sub> de 8 mg/kg y puede estar

presente en el medio ambiente hasta 391 días, lo cual convierte a este compuesto más tóxico y persistente que el endosulfán (Thangadura & Suresh, 2014).

Los estudios toxicológicos realizados a los demás metabolitos secundarios han demostrado que estos son menos tóxicos que el endosulfán, en cualquiera de sus 2 isómeros, así como del sulfato de endosulfán (Naqvi & Vaishnavi, 1992).



**Fig. 1.2** Ruta de degradación de endosulfán por microorganismos, propuesta por Thangadura & Suresh, 2014

El endosulfán al ser un plaguicida de uso común en México no cuenta con un límite permisible de su uso; sin embargo, en otros países como Alemania tiene un límite permisible de 0.05 mg/kg para suelos, en la Unión Soviética es de 0.1 mg/kg y la FAO establece un rango no mayor a 2 mg/kg.

Por otro lado, el límite permisible de este compuesto en vegetales de acuerdo con la comunidad europea no debe ser mayor de 0.2 mg/kg en las raíces y 1 mg/kg en las hojas; mientras que la Unión Soviética maneja un rango permisible de hasta 0.1 mg/kg.

Una de las alternativas para la remoción de este compuesto es el uso de microorganismos mediante diferentes procesos de biorremediación, los cuales en la mayoría de los casos no solamente eliminan el xenobiótico, sino que también mejoran la calidad del suelo.

#### **1.4 Biorremediación**

La biorremediación (BR) es el uso de los organismos (principalmente, microorganismos y plantas) para eliminar contaminantes que se encuentran en el suelo. Las tecnologías de biorremediación usan el potencial fisiológico de microorganismos y plantas, para eliminar o reducir la concentración de los contaminantes medioambientales, hasta los niveles que son aceptados por las agencias reguladoras o bien hasta eliminarlos para evitar sus riesgos ambientales.

La biorremediación puede ser aplicada *in situ*: directamente en los lugares contaminados; o *ex situ*: los contaminantes y/o el suelo, sedimentos, o residuos que los acompañan son retirados de los lugares contaminados y tratados en otros sitios usando bioreactores, biopilas, composteo u otra tecnología (Torres-Bustillos et al., 2012).

La bioestimulación es una de las técnicas de biorremediación más utilizadas, implica la adición o circulación de soluciones acuosas (que contengan nutrientes y/u oxígeno) a través del suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o bien, la inmovilización de contaminantes inorgánicos *in situ* (INE, 2007). La bioestimulación depende de los microorganismos autóctonos y por lo tanto requiere que éstos estén presentes y que el ambiente sea capaz de ser alterado de tal forma que tenga el efecto de biorremediación deseado. En la mayoría de los ambientes terrestres subterráneos, los organismos autóctonos han sido expuestos al contaminante por períodos de tiempo extendidos y se han adaptado o han sido seleccionados naturalmente ya que muchos contaminantes, especialmente compuestos orgánicos, existen naturalmente o cuentan con análogos naturales en el ambiente.

Por su parte la bioaugmentación que es otro tipo de BR consiste en la adición de microorganismos exógenos al sistema, los cuales tienen la capacidad de utilizar el xenobiótico como fuente de carbono; generan radicales libres que se son capaces de oxidar

el contaminante o segregan enzimas o metabolitos secundarios capaces de biotransformarlo (Izcapa-Treviño et al., 2009).

Existen otras técnicas de biorremediación como la fitorremediación, el composteo, bioventeo y bio labranza.

### **1.5 Uso de los biosurfactantes en la biorremediación**

Uno de los métodos económicamente viables para el tratamiento de suelos contaminados con agentes xenobióticos es la biorremediación *in situ*. En este proceso, una de las principales limitantes es la solubilidad de los contaminantes, los cuales en su mayoría tienen una naturaleza hidrofóbica por lo que se encuentran poco disponibles para ser degradados.

Normalmente los contaminantes de mayor peso molecular y menor solubilidad tienden a acumularse en los microporos del suelo, resultando fuentes de carbono inaccesibles para los microorganismos (Riojas et al., 2010).

Por lo que se ha recurrido a la utilización de agentes surfactantes sintéticos para atacar esta problemática; sin embargo, la permeabilidad de la membrana celular microbiana puede verse afectada negativamente por el uso de estos compuestos, lo que interferiría con la capacidad de los microorganismos para biodegradar otros contaminantes.

Una alternativa a esta situación es el uso de biosurfactantes (BS), los cuales son generalmente menos tóxicos que los surfactantes químicos, pero han probado ser igual de eficaces y más fácilmente biodegradables (Bachmann et al., 2014).

Además, es posible reducir aún más los costos de tratamiento utilizando microorganismos que producen sus propios BS y que también son capaces de degradar estos contaminantes (Odukkathil & Vasudevan, 2016).

La función del BS en un suelo contaminado es hacer biodisponible al xenobiótico, y este proceso se logra de dos maneras (Riojas et al., 2010):

- Aumentando la velocidad de dilución mediante la separación del contaminante en las micelas.
- Influyendo en el proceso de dilución mediante la interacción con la superficie del sustrato, esto afectará la máxima velocidad de dilución y puede aumentar el crecimiento microbiano; ya que una vez solubilizado el contaminante puede ser metabolizado por los microorganismos.

Los BS son metabolitos secundarios de algunos microorganismos, que contienen un segmento liposoluble (no polar) y otro hidrosoluble (polar). La solubilidad parcial, tanto en agua como en aceite permite al surfactante ocupar la interfase. Por lo que, reducen la tensión superficial e interfacial entre moléculas individuales en la superficie y la interfase, respectivamente (De Lima et al., 2009).

Dentro de los microorganismos productores de BS, se tiene principalmente a bacterias (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Serratia*, entre otras) y levaduras (*Candida* y *Yarrowia*); sin embargo, algunos hongos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Ustilago*) también han mostrado capacidad de producirlos (Christofi & Ivshina, 2002; Bhardwaj et al., 2013).

Los BS se clasifican atendiendo a tres criterios: naturaleza química, peso molecular y carga iónica de la parte superficialmente activa de la molécula. Debido a sus propiedades tales como: menor toxicidad, biodegradabilidad, mayor capacidad de formación de espuma y estabilidad a pH, salinidad y temperaturas extremas, los BS han sido más utilizados en procesos que previamente utilizaban tensoactivos sintéticos.

El BS producido depende del tipo de microorganismo productor; los pesos moleculares de los biosurfactantes microbianos suelen oscilar entre 500 y 1500 Da. Los BS de bajo peso molecular como los glicolípidos y glicopéptidos son típicamente más eficaces en la reducción de tensiones superficial e interfacial; mientras que los de alto peso molecular como los lipopolisacáridos y las lipoproteínas tienden a formar emulsiones (Pacwa et al., 2011). Para procesos de BR, lo ideal es contar con un bioproducto que tenga ambas propiedades.

Hasta la fecha, los BS son incapaces de competir económicamente con los compuestos sintetizados químicamente disponibles en el mercado, siendo una de las posibles razones el costo de los nutrientes necesarios para su producción (Bachman et al., 2014). Estos costos podrían reducirse significativamente mediante la utilización de fuentes alternativas de nutrientes con costos más bajos, así como al alcanzar altos rendimientos de producto.

Una posible solución para la primera aproximación sería la reutilización de residuos agroindustriales como fuente de carbono. Esta estrategia disminuiría los costos de producción de biosurfactantes, reduciendo al mismo tiempo la contaminación causada por la eliminación de residuos en vertederos.

### **1.6 Fuente de carbono en la producción de BS**

En la mayoría de los estudios relacionados con la producción de biosurfactantes a partir de microorganismos se han usado fuentes de carbono convencionales como glucosa, sacarosa y melaza (Guerra-Santos et al., 1984; Tahzibi et al., 2004; Anyanwu et al., 2010). Sin embargo, en los últimos años se han trabajado fuentes residuales agrícolas y/o industriales como aceites gastados de cocina y de procesos de destilación, sueros de la industria láctica, cáscara de cítricos, entre otros (Pacwa et al., 2011).

Los materiales lignocelulósicos son los sustratos indicados para el desarrollo de muchos hongos. Estos materiales constituyen el principal componente de los vegetales y sus residuos, así como de residuos agroindustriales, forestales y residuos sólidos urbanos, entre otros. La cáscara de naranja contiene azúcares solubles, lignina, celulosa y pectina como componente principal, lo cual la vuelve un sustrato idóneo para el crecimiento de hongos (Torrado et al., 2011), y representa un potencial para la producción de biosurfactantes.

Aunado a lo anterior, en 2018 se produjeron 8.13 millones de toneladas de cítricos en el país que tradicionalmente son utilizados en el proceso de compostaje, sin tomar en cuenta que estos son una fuente de carbono idónea para el desarrollo de hongos por sus componentes y características como su pH.

### **1.7 Fuente de nitrógeno en la producción de BS**

En el desarrollo de un microorganismo, la fuente de nitrógeno juega un papel importante para la producción de proteínas, el crecimiento y la producción de enzimas durante el proceso de fermentación (Xia et al., 2013). Las fuentes de nitrógeno inorgánicas convencionales son los nitratos o cloruro de amonio, mientras que las orgánicas son la urea, peptona y extracto de levadura.

En cuanto al papel que juega la fuente de nitrógeno en la producción de BS, autores como Wu et al. (2008) mencionan que el uso de fuentes orgánicas favorece el crecimiento del microorganismo, sin embargo, inhibe la formación de glicolípidos. Mientras que Saharan et al., (2011) han relacionado la producción de BS con el agotamiento de la fuente de nitrógeno, encontrando la máxima producción de BS en la fase estacionaria y asociando la producción de este metabolito con una limitante de la fuente de Nitrógeno.

### **1.8 Bioaugmentación como tratamiento de biorremediación**

Si bien la adición de BS a los sistemas hace accesibles los compuestos de naturaleza hidrofóbica para ser biotransformados, en ocasiones los microorganismos endógenos del sistema no tienen la capacidad de metabolizarlo o su metabolismo es más tardado por lo que una alternativa para acelerar este proceso es la bioaugmentación.

Para la remoción de plaguicidas organoclorados y mejoramiento de suelos salinos el género *Penicillium* ha sido estudiado, tanto por la producción de radicales libres capaces de oxidar los xenobióticos; así como la producción de ácidos orgánicos y su capacidad de solubilizar fosfatos para mejorar las propiedades fisicoquímicas del suelo (Izcapa-Treviño et al., 2009; Mateo-Hernández, 2018).

Los procesos de bioaugmentación con el género *Penicillium* han sido ampliamente estudiados; abarcando desde precipitación de metales (Chang et al., 2020; Khodja et al., 2018), reducción de la toxicidad de dioxinas di venzo policloradas (Delsarte et al., 2021), remoción de crudos (Neior & Mene, 2007), biodegradación de compuestos alifáticos y aromáticos (Govarthanan et al; 2017; Alamoori et al., 2018), entre otros.

## 1.9 Estrés fisiológico en vegetales

Los efectos de los plaguicidas organoclorados ya han sido abordados anteriormente; sin embargo, no se ha mencionado el efecto de la salinidad, la cual es la principal causa de pérdida de fertilidad de la zona chinampera.

La salinidad causa estrés fisiológico a los cultivos, el cual se ve reflejado en una reducción de la adsorción de nutrientes por las raíces, lo que afecta su capacidad agrícola y la calidad del producto final (Botella-Marrero, 2017).

Los cultivos al presentar estrés fisiológico sufren una alteración en su actividad metabólica lo que a su vez se ve reflejado en la actividad enzimática, generando un aumento de aminoácidos, cambios en los patrones de proteínas y contenido de agua entre otros (Neto et al., 2004).

Algunos componentes de la salinidad en los cultivos están asociados a la toxicidad de los iones, la acumulación de las en las raíces altera la homeostasis por una inhibición en la toma de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y la acumulación de  $Na^+$  y  $Cl^-$  (Paranychianakis & Chartzoulakis, 2005).

Por su parte, la salinidad también podría estar asociada con la inhibición del crecimiento y la fotosíntesis, así como a la deshidratación celular, dado el estrés hídrico o el lento crecimiento debido a la acumulación de sales (Munns y Tester, 2008). El comportamiento de la fotosíntesis podría verse afectado dado una limitación en la difusión de  $CO_2$  (Ashraf y Harris, 2013) generando una reducción en el contenido de pigmentos fotosintéticos; la inhibición de la fotosíntesis también podría estar asociada con una reducción en el número y tamaño de las hojas, lo que afecta la absorbancia de la luz (Alvino et al., 2000).

Grigore et al., (2011) mencionan tres mecanismos de respuesta de las plantas al estrés por salinidad; el 1º está asociado al control de la homeostasis iónica y al equilibrio osmótico, el 2º está relacionado con la síntesis de “moléculas reguladoras” como prolina o azúcares, y el 3º está asociado a la activación de sistemas antioxidantes químicos y enzimáticos.

En 2017, México fue el 6º país con la mayor producción de frijol (género *Phaseolus*) y en 2019 se convirtió en el 3º cultivo más sembrado en el país, teniendo 1,411,550 hectáreas

plantadas de las cuales 5,077 pertenecieron a la zona agrícola de la Ciudad de México (FIRA, 2019). Por lo anterior, este cultivo fue seleccionado como cultivo modelo para este proyecto; además de que es una planta de crecimiento rápido.

Las plantas de frijol han sido reportadas como cultivos capaces de germinar en condiciones de estrés salino, teniendo afectaciones en su desarrollo y actividad metabólica; siendo la prolina un importante osmolito que se acumula bajo condiciones de estrés, pues se ha visto que un aumento en este aminoácido permite el equilibrio osmótico del vegetal en condiciones salinas, temperaturas extremas o de sequía, entre otros, siendo capaz de actuar como osmoprotector, molécula señalizadora y fuente de carbono y nitrógeno (Hoai et al., 2003; Szabados & Saviouré 2010).

Otro tipo de osmolito sintetizado bajo condiciones de estrés son los azúcares los cuales tienen múltiples funciones biológicas, desde productos de fotosíntesis directa hasta componentes del metabolismo primario y moléculas reguladoras; en condiciones de estrés aumentan buscando estabilizar el desarrollo del cultivo.

Por otro lado, cuando un cultivo es expuesto a estrés oxidativo como el que se podría asumir existe al utilizar agroquímicos; el vegetal es capaz de activar sistemas antioxidantes, enzimáticos (super oxido dismutasa, glutatión reductasa, catalasas, entre otros) y no enzimáticos (compuestos fenólicos y flavonoides) los cuales actúan como una barrera secundaria para contrarrestar las especies reactivas de oxígeno como peróxidos, ozono o radicales hidroxilos entre otros (Bautista et al., 2016).

## 2. Antecedentes

### 2.1 Uso de biosurfactantes en tratamientos de biorremediación

El uso de surfactantes para favorecer la remoción de compuestos hidrofóbicos orgánicos es un proceso que lleva bastante tiempo estudiado; sin embargo, en ocasiones el uso de surfactantes químicos genera productos más tóxicos que el contaminante inicial, por ello se ha buscado la utilización de BS en sitios contaminados que se buscan biorremediar. La producción de BS se ha evaluado principalmente utilizando bacterias; sin embargo, se tiene conocimiento que los hongos filamentosos también tienen la capacidad de producir este metabolito (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1** Hongos productores de biosurfactantes

Microorganismo	Propiedades del BS E <sub>24</sub> (%) TS (mN/m)	Fuente de C y N (g/L)	Referencia
<i>Penicillium chrysogenum</i>	E <sub>24</sub> : 45	aceite	Gautman et al., 2014
<i>P. citrinum</i>	E <sub>24</sub> : 80	diesel	Camargo de Morais et al., 2003
<i>P. decumbens</i>	TS: 60.13	10 de aceite de oliva 7.53 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Yuan et al., 2006
<i>Penicillium sp.</i>	E <sub>24</sub> : 60	10 dextrosa 3 extracto de malta 2 extracto de levadura	Luna et al., 2007
<i>Aspergillus flavus</i>	TS: 35.7 E <sub>24</sub> : 64	10 glucosa 1 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 peptona	Ishaq et al., 2015
<i>A. niger</i>	E <sub>24</sub> : 55	5 glucosa 5 peptona	Colin et al., 2010
<i>Trichosporon montevidense</i>	TS: 44.9 E <sub>24</sub> : 75.8	10 sucrosa 2 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 20 aceite de soya 1 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Monteiro et al., 2009

TS: Tensión superficial; E<sub>24</sub>: Actividad emulsificante a las 24 h.

La ventaja de utilizar hongos durante el proceso de BR es su desarrollo en medios ácidos, por lo que pueden desarrollarse *in situ* en suelos con estas características, sin problema alguno; además los hongos al desarrollarse segregan ácidos orgánicos los cuales actúan como agentes quelantes que, en suelos salinos, favorecen la disminución de la salinidad mejorando sus propiedades fisicoquímicas. Por su parte, la adición de hongos en suelos alcalinos favorece la neutralización de estos (Izcapa-Treviño et al., 2007).

Sin embargo, la mayoría de los trabajos sobre la aplicación de BS para la remoción de plaguicidas en suelos agrícolas, ha estado principalmente enfocada en bioproductos formados por bacterias destacando el ramnolípido producido por *P. aeruginosa* (Tabla 2.2); cabe destacar que hasta el momento no se tienen reportes de la aplicación de BS producido por hongos.

**Tabla 2.2** Microorganismos productores de biosurfactantes usados en procesos de biorremediación de plaguicidas

Microorganismo	Propiedades del BS CMC (mg/L) E <sub>24</sub> (%) TS (mN/m)	Biodegradación (%)	Referencia
<i>Arthrobacter sp.</i>	TS: 27 E <sub>24</sub> : 50	81.8 (Endosulfán α) 76.3 (Endosulfán β)	Odukkathil et al., 2013
<i>Burkholderia cenocepacia</i> BSP3	TS: 25 E <sub>24</sub> : 90 % CMC: 316	Aumentó la solubilidad de metil paratión, etil paratión y trifluralina	Wattanaphon et al., 2008
<i>P. aeruginosa</i> CH7	TS: 37.4	90 cipermetrina	Zhang et al., 2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TS: 28 CMC: 0.038 g/L	100 hexaclorociclohexano	Sharma et al., 2009
<i>Pseudomonas sp.</i>	CMC: 0.2 g/L	91.7 clorpirifós	Singh et al., 2009

CMC: Concentración micelar crítica; TS: Tensión superficial; E<sub>24</sub>: Actividad emulsificante a las 24 h.

Bustamante et al., (2012) explicaron los 3 posibles mecanismos por los que un compuesto orgánico hidrofóbico puede estar biodisponible para ser degradado por diferentes microorganismos, cuando está presente un biosurfactante:

- Emulsificación del contaminante; en este proceso el BS disminuye la tensión interfacial (TI) formada entre el suelo y el contaminante dando paso a la formación de macro y micro emulsiones.
- Mejora aparente de la solubilidad del contaminante; este proceso está dado por la incorporación del contaminante a las micelas del BS y por lo tanto a la fase acuosa.
- Accesibilidad del contaminante a la célula de los microorganismos degradadores; este último mecanismo normalmente involucra alguno de los 2 anteriores y mejora la biodisponibilidad del contaminante para ser utilizado como fuente de carbono para su biodegradación.

## **2.2 Bioaumentación como tratamiento de BR en suelos contaminados con endosulfán**

La tabla 2.3 muestra las tasas de remoción que se han alcanzado con diferentes hongos aplicados a suelos contaminados con endosulfán, encontrándose remociones desde el 50% hasta un máximo de 91% en tiempos que van desde los 15 hasta los 60 días.

Hay que considerar que independientemente de las propiedades con las que cuente el microorganismo para degradar el xenobiótico, la tasa de remoción está relacionada con las propiedades fisicoquímicas del suelo, pues se sabe que en suelos arcillosos es más difícil remover un xenobiótico ya que se queda incrustado a sus partículas (Hosseininoosheri et al., 2016).

**Tabla 2.3** Bioaumentación en suelos contaminados con endosulfán

<b>Microorganismo</b>	<b>Biodegradación (%)</b>	<b>Tiempo (días)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Penicillium sp.</i>	80	30	Mohanasrinivasan et al., 2013
<i>Fusarium</i>	91.1 endosulfán $\alpha$	15	Siddique et al., 2003
<i>ventricosum</i>	89.9 endosulfán $\beta$		
<i>Trametes shirsuta</i>	100		
<i>Trametes versicolor</i>	90.96	15	Bisht et al., 2019
<i>Penicillium frequentans</i>	90.80		
<i>Aspergillus terricola</i>	74.7 endosulfán $\alpha$	12	Hussain et al., 2007
	71.8 endosulfán $\beta$		
<i>Aspergillus sydoni</i>	89.3 endosulfán $\alpha$	60	Goswami et al., 2009
	76.3 endosulfán $\beta$		
<i>Mortierella sp.</i>	70 endosulfán $\alpha$	28	Kataoka et al., 2010
	50 endosulfán $\beta$		

### 2.3 Estrés abiótico en cultivos por salinidad y agroquímicos.

Como se abordó en la introducción, tanto la salinidad como el uso de agroquímicos generan un estrés fisiológico en el desarrollo de los cultivos; lo que se ve reflejado de forma morfológica (índice de germinación más bajo; menor biomasa y tamaño de cultivo o número de hojas); así como bioquímicamente (activación de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, menor producción de pigmentos fotosintéticos, producción de aminoácidos y otros osmolitos como mecanismos de defensa).

La tabla 2.4 muestra la respuesta de diferentes vegetales expuestos a plaguicidas organoclorados mientras que la 2.5 muestra el estrés abiótico que representa para los cultivos desarrollarse en suelos salinos; encontrándose en ambos casos alteraciones tanto morfológicas como bioquímicas.

**Tabla 2.4** Fitotoxicidad en cultivos expuestos a plaguicidas organoclorados

<b>Cultivo</b>	<b>Daño</b>	<b>Referencia</b>
Jitomate con DDT	Reducción de biomasa: 49 % Doble de peroxidación lipídica comparada con control	Mitton et al., 2014
Girasol con DDT	Reducción de biomasa: 70 % 30 % de peroxidación lipídica comparada con control	Mitton et al., 2014
Soya con DDT	Reducción de longitud aérea: 55 % 50 % de peroxidación lipídica comparada con control	Mitton et al., 2014
Trigo con hexaclorociclohexano	47 % de inhibición de germinación 92% de disminución de parte aérea 98% de disminución de raíz	Pereira et al., 2010
Cebada con hexaclorociclohexano	30 % de inhibición de germinación 50% de disminución de parte aérea 98% de disminución de raíz	Pereira et al., 2010
Chícharo con hexaclorociclohexano	65 % de inhibición de germinación 37 % de disminución de raíz	Pereira et al., 2010
Fríjol con hexaclorociclohexano	17 % de inhibición de germinación 60% disminución de parte aérea 88% de disminución de raíz	Pereira et al., 2010
Rábano con hexaclorociclohexano	93 % de inhibición de germinación 60 % reducción de act. de amilasa	Bidlan et al., 2004
Frijol mungo con hexaclorociclohexano	93 % de inhibición de germinación 60 % reducción de act. de amilasa 50 % reducción act. de proteasa	Bidlan et al., 2004

**Tabla 2.5** Fitotoxicidad en cultivos expuestos a salinidad

<b>Cultivo</b>	<b>Daño</b>	<b>Autor</b>
Frijol con 100 mM de NaCl	47% menos peso 4 veces más producción de prolina 25% menos producción de clorofila	Stoeva & Kaymakanova, 2008
Frijol con 100 mM de NaCl	23 % reducción foliar 55% reducción de raíz	Gama et al., 2007
Adelfa con 800 mM de NaCl	76 % menos peso 76 % menos clorofila 56 % más producción de MDA 23 % más producción de fenoles 66 % mayor act de SOD; 45 % más act CAT; 89.13 % más act APX; 60 % más act GR	Kumar et al., 2017
Ayocote con 150 mM de NaCl	60 % reducción foliar 80 % menos peso 10 veces más producción de prolina	Mohamad et al., 2016
Frijol con 50 mM de NaCl	11 % menos act de SOD 5% más act de APX	Jebara et al., 2005
Lárice europeo con 150 mM de NaCl	60 % menos peso 33% menos clorofila 8 veces más producción de prolina 1.5 más producción de azúcares, MDA y fenoles	Plesa et al., 2018

## 2.4 Antecedentes del grupo de investigación

La producción y aplicación de los biosurfactantes, han sido estudiados en el grupo de investigación de Compuestos Xenobióticos, del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV, en donde se han empleado diferentes microorganismos en procesos de biorremediación y producción de BS, como: *Bacillus cereus* (Velázquez 2010; Velázquez-Aradillas et al., 2011), *Pseudomonas fluorescens* en procesos de fitorremediación en ambientes hidropónicos (Solís, 2007; Solís et al., 2007), *Pseudomonas putida* (Amezcuca, 2004; Amezcuca et al., 2004; Martínez, 2005; Martínez et al., 2011) y *Candida* (Amezcuca et al., 2007) para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos polinucleoaromáticos y *Penicillium sp.* (Luna, 2003; Luna, 2006; Luna et al., 2007).

En los últimos años se ha trabajado en el consorcio microbiano desarrollado en la cáscara de naranja por su capacidad oxidante para los diferentes xenobióticos presentes en la zona Chinampera de la Ciudad de México, así como la utilización de la capacidad solubilizadora de fosfatos y la segregación de ácidos orgánicos por algunos microorganismos desarrollados en el consorcio para mejorar las propiedades fisicoquímicas del suelo (Mora-Chablé; 2016 / Hernández-Mateo; 2018 / Escobar-Sánchez; 2020). De aquí se desarrolla la presente investigación, ya que de este consorcio fue aislado el microorganismo *Penicillium curstosum* buscando evaluar su capacidad productora de BS, así como su papel en la biorremediación de suelos contaminados con endosulfán y mejoramiento de cultivos.

### 3. Justificación

Debido a la tardía legislación sobre el uso de plaguicidas organoclorados, así como a su persistencia en el ambiente, existe una gran cantidad de suelos agrícolas contaminados con estos y otros agroquímicos. Estos compuestos en su mayoría tienden a ser bioacumulados por plantas y animales, los cuales posteriormente son consumidos por el ser humano causando alteraciones a su salud.

Los contaminantes ambientales de naturaleza hidrofóbica, tales como los plaguicidas, presentan solubilidades bajas, lo cual es una limitante para ser degradados por las células microbianas. Los biosurfactantes pueden mejorar la disponibilidad de los materiales hidrofóbicos, aumentando así su solubilidad en agua. Por lo tanto, la presencia de BS puede aumentar la degradación microbiana y la remoción de los plaguicidas.

Por otro lado, la producción de biosurfactantes, constituye una aportación a la investigación para su aplicación tecnológica en el área de biorremediación, debido a que se ha reportado que los biosurfactantes presentan estabilidad en condiciones extremas de pH, temperatura y salinidad, sin que se afecten sus propiedades surfactantes. Además de que en la mayoría de los trabajos realizados en cuanto a la producción de BS solamente se han evaluado bio-productos segregados por bacterias y levaduras, teniendo un porcentaje mínimo en cuanto a la producción por hongos.

Los hongos tienen la capacidad de crecer y desarrollarse en diversos residuos agrícolas, como los lignocelulósicos y derivados de cítricos. Por lo que en este proyecto el uso de un residual cítrico para obtener un microorganismo productor de BS, además de generar un producto de valor agregado, puede disminuir los costos de producción. Además, la aplicación *in situ* garantiza el empleo del microorganismo para la remoción del plaguicida, así como la segregación de ácidos orgánicos al suelo los cuales ayudarán en la remoción de la salinidad mejorando las propiedades fisicoquímicas del mismo.

Finalmente, la capacidad endófitas reportada para el género *Penicillium* favorecerá el desarrollo de un cultivo modelo (*Phaseolus leptostachyus*) generando así un beneficio integral para la zona chinampera.

## 4. Hipótesis

El consorcio desarrollado en la cáscara de naranja, y el microorganismo *Penicillium crustosum* tendrán la capacidad de desarrollarse en un suelo salino contaminado con endosulfán, accediendo al xenobiótico mediante la producción *in situ* de un BS, degradando el plaguicida y mejorando las propiedades fisicoquímicas del suelo; además la capacidad endófitra del hongo favorecerá el desarrollo de las plantas de *Phaseolus leptostachyus* presentando mejores propiedades morfológicas y bioquímicas, que sus análogas desarrolladas en un suelo salino y un suelo salino con endosulfán.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad productora de biosurfactante de un microorganismo aislado del consorcio microbiano desarrollado de la cascara de naranja, para la degradación de endosulfán en un suelo salino y su beneficio en el desarrollo de un cultivo modelo (*Phaseolus leptostachyus*).

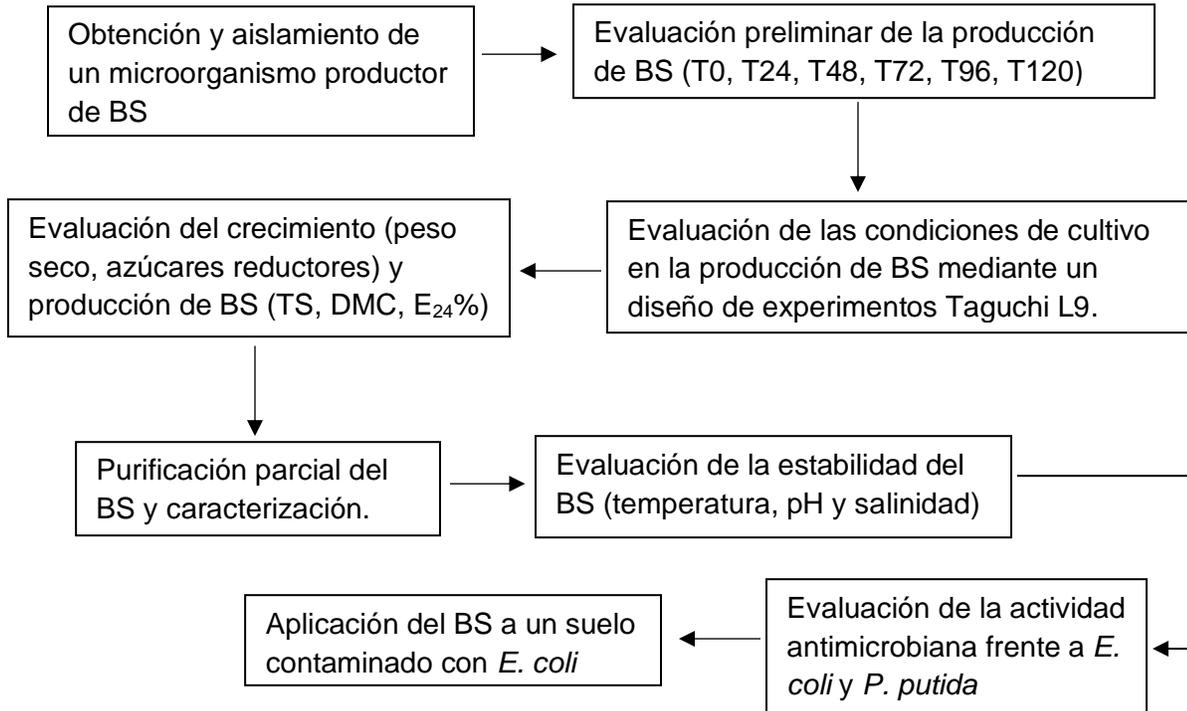
### 5.2 Objetivos específicos

- Obtención de un microorganismo productor de BS a partir del consorcio desarrollado en la cáscara de naranja.
- Determinar las propiedades del BS producido, en cuanto a su actividad tensoactiva, emulsificante y dilución micelar crítica.
- Evaluar el efecto de diferentes condiciones de cultivo en la producción del BS mediante un diseño de experimentos Taguchi L9.
- Caracterizar parcialmente la composición del BS producido en cuanto a su contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas y mediante IR.

- Evaluar la estabilidad del BS producido en condiciones extremas de pH, salinidad y temperatura.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del BS en un suelo contaminado con *E.coli*.
- Evaluar el efecto que tienen los diferentes tratamientos en la remoción de endosulfán, así como en el mejoramiento de la calidad de suelo.
- Evaluar el efecto que tienen los diferentes tratamientos en el desarrollo del cultivo de *Phaseolus leptostachyus*; en cuanto a sus propiedades morfológicas (altura, números de hojas y biomasa fresca y seca) y bioquímicas (cuantificación de pigmentos fotosintéticos, prolina, azúcares, MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fenoles, flavonoides, SOD, CAT, APX y GR).

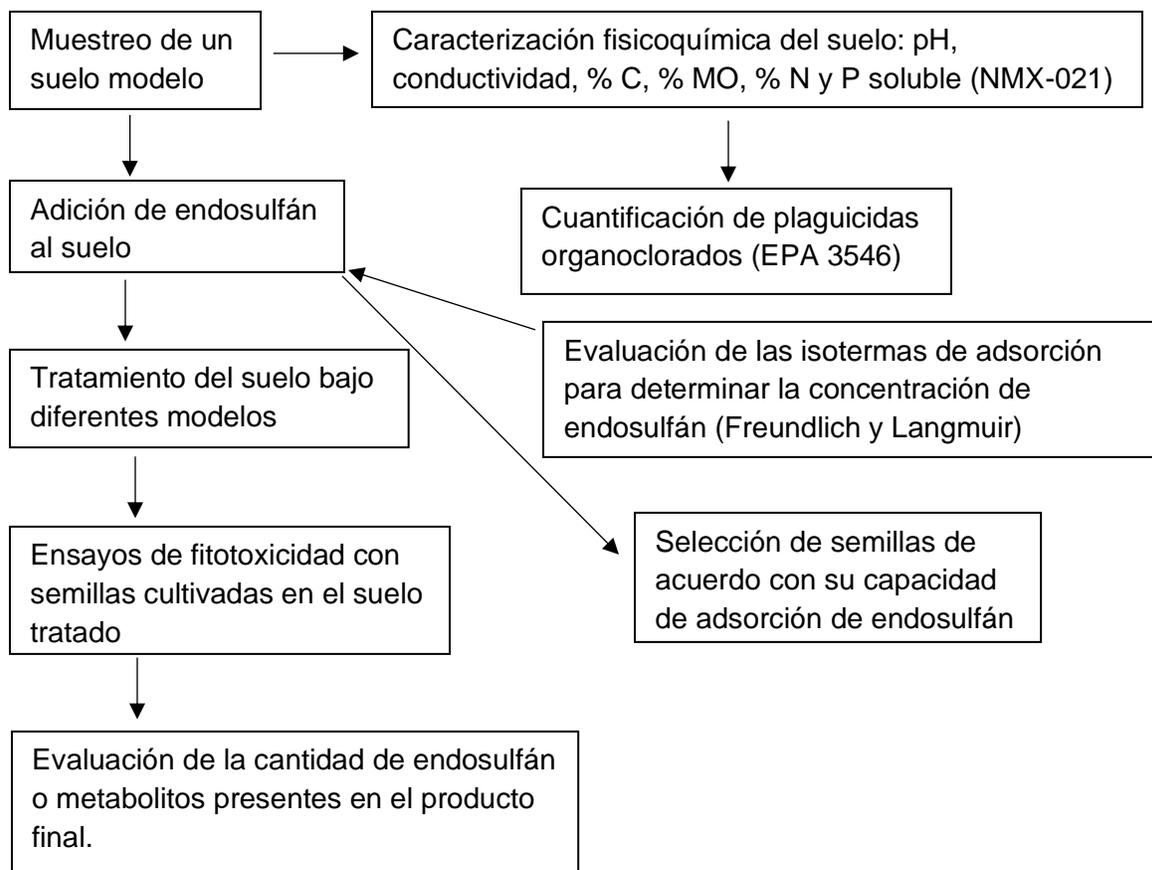
## 6. Estrategia experimental

**Fase I:** Obtención de un consorcio y aislamiento de un microorganismo productor de BS.



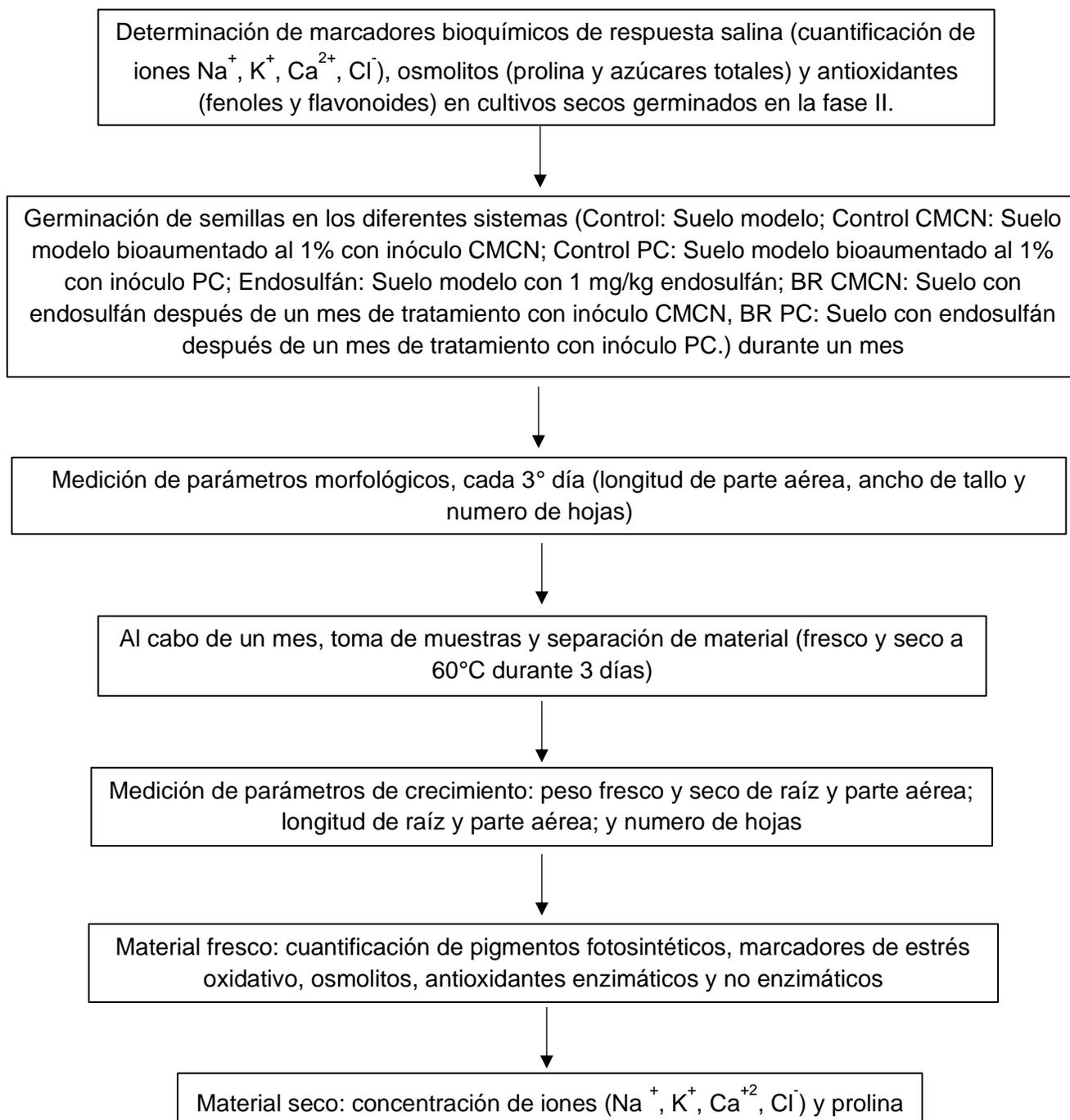
BS: Biosurfactante; TS: Tensión superficial; DMC: Dilución micelar crítica; E<sub>24</sub>: Actividad emulsificante a las 24 h.

**Fase II:** Evaluación del efecto del BS en la biodegradación de endosulfán, en un suelo contaminado



Suelo modelo: Suelo proveniente de la zona chinampera libre de plaguicidas organoclorados; BS: Biosurfactante.

**Fase III:** Evaluación del estrés abiótico en vegetales germinados en los diferentes sistemas  
(Realizada en la UPV)



Suelo modelo: Suelo proveniente de la zona chinampera libre de plaguicidas organoclorados. CMCN: Consorcio microbiano utilizado para el proceso de biorremediación desarrollado por el grupo de trabajo. PC: *Penicillium crustosum*. UPV: Universidad Politécnica de Valencia.

## **7. Metodología**

### **Fase I**

#### **7.1 Obtención del microorganismo**

Cáscaras de naranja provenientes de la cafetería del CINVESTAV, Zacatenco fueron recolectadas, lavadas y el bagazo fue retirado. Con una perforadora se obtuvieron discos del residuo y se dejaron inocular a 30°C, controlando la humedad al 80% durante 5 días; pasado este tiempo una capa verde se formó sobre ellas (inóculo CMCN).

Un gramo de base seca de inóculo CMCN fue diluido en 9 mL con solución salina 0.85 % y de esa solución se tomó un mL que se diluyó en 9 mL de solución salina 0.85 % y así sucesivamente hasta llegar a la dilución  $10^6$ . Todo este proceso se realizó por triplicado.

Las diluciones se inocularon en PDA con rosa de Bengala con el fin de obtener colonias definidas. A partir de estos cultivos, el hongo más abundante fue con el que se decidió trabajar para los siguientes experimentos.

Una cosecha de esporas fue realizada con el hongo seleccionado y estas se cultivaron en cajas Petri en medio PDA para preparar inóculo para los experimentos posteriores. El microorganismo fue inoculado en 50 mL de medio de cultivo en matraces de 125 mL e incubado en un agitador orbital a 30°C y 120 rpm durante 15 días. El medio de cultivo utilizado se muestra en la tabla 7.1.

**Tabla 7.1** Medio de cultivo para la producción de biosurfactante

<b>Componente</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
Glucosa	5
Residuo cítrico	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
MnSO <sub>4</sub>	0.03
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.875
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.125
CaCl <sub>2</sub>	0.1
NaCl	0.1
FeSO <sub>4</sub>	0.01
Peptona	2

Para la inhibir el crecimiento bacteriano y favorecer el crecimiento del hongo se disminuyó el pH agregando 14 mL de ácido tartárico al 10 % por cada litro de medio de cultivo.

### **7.1.1 Identificación del microorganismo**

El microorganismo obtenido fue identificado por técnicas de biología molecular, para esto se tomaron 500 mg de biomasa para la extracción de ADN por medio del kit ZR Fungal / Bacterial DNA Mini Prep.

El fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S se amplificó utilizando los nucleótidos ITS5 y ITS4 mediante la metodología descrita por White (1990) utilizando un gel de agarosa 1% por 15 min a 100 V.

Las secuencias fueron editadas manualmente por medio del programa Chromas 2.4 (2012) comparadas con el programa nucleotide BLAST del Centro Nacional de Información

Biocnol3gica (NCBI) y finalmente la secuencia fue depositada en el GenBank baj3 el n3mero de registro MG009431.

## **7.2 Procesamiento de los caldos de cultivo**

Tanto el microorganismo aislado del residuo c3trico, como el residuo, fueron adicionados en el medio mineral (MM) descrito en la secci3n 7.1, en matraces de 125mL con 50 mL de MM. Estos sistemas fueron incubados durante 10 d3as en un agitador orbital a 30°C y 120 rpm.

Cada 2 d3as, 3 matraces fueron retirados, el caldo de cultivo fue filtrado al vac3o y centrifugado a 10,000 rpm, a 4°C durante 15 minutos. Al sobrenadante resultante se le evalu3 la tensi3n superficial, diluci3n micelar cr3tica y su actividad emulsificante a las 24 h con di3sel, como se menciona a continuaci3n.

## **7.3 Evaluaci3n de la producci3n de biosurfactante**

### **7.3.1 Tensi3n superficial**

Esta t3cnica fue realizada mediante el m3todo del anillo de Du Noüy utilizando un tensi3metro marca Krüss modelo K6. Este m3todo se basa en aplicar la fuerza necesaria para vencer la tensi3n superficial de las muestras analizadas (Youssef et al., 2007), mediante el desplazamiento vertical de un anillo de platino. Cuando el anillo est3 dentro del l3quido a evaluar y se retira verticalmente, se ejerce una fuerza directamente proporcional a la tensi3n superficial del l3quido.

Para verificar el buen funcionamiento del tensi3metro se midi3 la tensi3n superficial del agua, reportada en 72.2 mN/m a 20 °C (Shaw, 1992).

### **7.3.2 Actividad emulsificante**

Esta medici3n se llev3 a cabo siguiendo la t3cnica de Pruthi y Cameotra (1997); en un tubo de ensayo de 20 mL, se agregaron 5 mL del sobrenadante y 5 mL de di3sel, la mezcla se agit3 en v3rtex durante 2 min y se dej3 reposar 24 h. Una vez que transcurri3 este tiempo,

con una regla se midió el tamaño de la emulsión y se calculó como se indica en la ecuación 1:

$$E_{24}(\%) = \frac{E_f}{H_t} * 100 \dots\dots\dots \text{Ec.1}$$

Donde:

E<sub>24</sub>: Índice de emulsificación (%) a las 24 h.

E<sub>f</sub>: Altura de la emulsión formada.

H<sub>f</sub>: Altura total.

### **7.3.3 Dilución micelar crítica**

Al sobrenadante libre de células se le realizaron diluciones con agua destilada con la finalidad de evaluar su actividad tensoactiva y determinar la dilución máxima en la que el BS sigue teniendo la misma actividad, la cual corresponde a la dilución micelar crítica (DMC).

## **7.4 Evaluación del crecimiento y consumo de sustrato**

### **7.4.1 Cuantificación de biomasa**

Se realizó mediante la evaluación del peso seco. Para llevar a cabo esta técnica se pusieron papeles filtros a peso constante los cuales fueron utilizados para filtrar el caldo de cultivo con vacío. La biomasa resultante se puso a secar a 105°C durante 30 min y los papeles fueron posteriormente puestos en un desecador. Estos fueron pesados hasta obtener peso constante. La diferencia entre el peso final y el inicial de los papeles fue el resultado de la biomasa evaluada.

### **7.4.2 Azúcares reductores**

Los azúcares reductores fueron evaluados por la técnica de DNS (Miller, 1959). Este método determina la presencia de grupos carbónicos libres (C=O) de los azúcares reductores. El procedimiento se basa en una reacción redox, que ocurre en la utilización de

ácido 3,5 dinitrosalicílico para provocar la oxidación de los azúcares y al mismo tiempo su propia reducción. Un mol de azúcar reacciona con un mol de ácido 3,5 dinitrosalicílico, dando lugar a una reacción estequiométrica que permite conocer la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra.

## **7.5 Selección de las condiciones del medio de cultivo para la producción de BS**

Con la finalidad de evaluar el efecto del tipo de fuente de C y N, el pH inicial del medio de cultivo y la agitación en la producción de BS un diseño de experimentos Taguchi L9 fue realizado (Tabla 7.2).

El método de Taguchi está basado en un arreglo ortogonal que puede ser usado para analizar un gran número de variables a diferentes niveles cada una y con una cantidad pequeña de experimentos. Con este método se puede optimizar procesos y además determinar la relación entre variables contrastándose aquellas interacciones que se cree afectan las características funcionales bajo estudio (Mohan et. al., 2007).

El diseño experimental estuvo conformado por nueve tratamientos, los cuales se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 50 mL del medio mineral descrito en la Tabla 7.1, con las variables a evaluar ajustadas. Los tratamientos se realizaron por triplicado y cada uno con su respectivo control sin inocular. La relación C/N se mantuvo constante a 20.

Los resultados fueron analizados con el software Statistica V8, evaluándose la tensión superficial y la actividad emulsificante ( $E_{24}$ ) como variables respuesta. Dado el trabajo preliminar se seleccionaron los días 6 y 12 para analizar resultados del cambio de la tensión superficial ( $\Delta TS$ ) y  $E_{24}$  respectivamente.

**Tabla 7.2** Diseño de experimentos Taguchi L9

Tratamiento	Fuente de C	Fuente N <sub>2</sub>	Agitación (rpm)	pH
1	Aceite de soya	Peptona	100	3
2	Aceite de soya	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	120	5
3	Aceite de soya	KNO <sub>3</sub>	150	7
4	Glucosa	Peptona	120	7
5	Glucosa	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	150	3
6	Glucosa	KNO <sub>3</sub>	100	5
7	Residuo cítrico	Peptona	150	5
8	Residuo cítrico	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	100	7
9	Residuo cítrico	KNO <sub>3</sub>	120	3

## 7.6 Purificación parcial del BS

Una vez obtenido el mejor medio de cultivo, se procedió a purificar el bioproducto del tiempo donde se encontró la mayor actividad emulsificante y presentó actividad tensoactiva.

Para llevar a cabo la purificación 3 metodologías fueron evaluadas: 1) precipitación con acetona fría, 2) extracción con hexano y acetato de etilo; y 3) precipitación ácida seguida de una extracción con cloroformo y etanol, con la finalidad de encontrar un producto con mayor rendimiento.

### 7.6.1 Purificación con acetona

Para llevar a cabo esta purificación se lavó el sobrenadante libre de células con acetona en una relación 1:3 v/v. Esta mezcla se dejó reposar a 4°C durante 72 h y el precipitado formado fue filtrado y eliminado (Camargo de Morais et al., 2003).

La fase líquida fue colocada en el rotavapor marca Büchi modelo R114 con baño maría a 40°C y a vacío con la finalidad de eliminar la acetona. Al líquido resultante se le evaluó su actividad tensoactiva y emulsificante.

### **7.6.2 Extracción con hexano y acetato de etilo**

Para llevar a cabo esta purificación al sobrenadante se le realizó una extracción con hexano, seguida de otra con acetato de etilo, los extractos fueron puestos en un rotavapor marca Büchi modelo R114 con baño maría a 60°C y a vacío con la finalidad de eliminar el disolvente residual. Al líquido resultante se le evaluó su actividad tensoactiva y emulsificante (Luna-Velasco, 2006).

### **7.6.3 Precipitación ácida seguida de extracción con cloroformo y etanol.**

En esta purificación el sobrenadante libre de células fue acidificado con HCl 6M hasta llegar a un pH de 2; el producto se dejó reposar 18 h a 4°C. Pasado este tiempo se agregó un volumen semejante de NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M y se realizó una extracción con cloroformo:etanol (2:1). El extracto obtenido fue puesto en el rotavapor marca Büchi modelo R114 con baño maría a 60°C y a vacío con la finalidad de eliminar el solvente residual (Pornsunthorntawee et al., 2008). Al líquido resultante se le evaluó su actividad tensoactiva y emulsificante.

## **7.7 Estabilidad del biosurfactante**

Una vez purificado el producto, se evaluó su estabilidad a diferentes condiciones de temperatura, pH y salinidad mediante la determinación de tensión superficial y actividad emulsificante. Estas condiciones son importantes y determinantes para la aplicación de los biosurfactantes en diversos procesos (Banat et al., 2000).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, reportándose la media  $\pm$  la desviación estándar.

### **7.7.1 Estabilidad al pH**

La estabilidad del biosurfactante se evaluó en el intervalo de pH de 2 a 12. Para esto se utilizaron 15 mL del sobrenadante y se midió su pH con ayuda de un potenciómetro marca Martini Instruments modelo Mi 150. Para obtener valores ácidos de pH, el sobrenadante se ajustó con HCl 1 N en decrementos de una unidad.

Mientras que, para obtener valores de pH alcalinos, el sobrenadante se ajustó con NaOH 1 N en incrementos de una unidad. En cada valor de pH se evaluó la  $E_{24}$  y la TS por triplicado.

### **7.7.2 Estabilidad a la salinidad**

La estabilidad del biosurfactante se evaluó a diferentes salinidades, desde 0 hasta 200 g/L de NaCl; para esto, se utilizó un volumen de 15 mL del sobrenadante y se disolvió la cantidad necesaria de NaCl para alcanzar las concentraciones salinas a evaluar: 0, 5, 10, 20, 40, 80, 140 y 200 g/L. En cada concentración se determinó la  $E_{24}$  y la TS por triplicado.

### **7.7.3 Estabilidad a la temperatura**

La estabilidad del biosurfactante se evaluó a diferentes temperaturas, en un rango de 25 a 100° C. Se tomaron muestras de 15 mL las cuales fueron incubadas a 25, 40, 60, 80 y 100°C por triplicado cada una, durante 4 y 18 h. Después de este tiempo se dejaron 30 min a temperatura ambiente y se evaluó la  $E_{24}$  y la TS por triplicado.

## **7.8 Caracterización del BS**

Al BS parcialmente purificado se le evaluó su composición general mediante la determinación de carbohidratos totales, lípidos y proteínas.

Además, se realizó la prueba de agar azul con la finalidad de conocer la naturaleza iónica del surfactante producido y se evaluaron los grupos funcionales mediante espectrometría de infrarrojo.

### **7.8.1. Carbohidratos totales**

Para este análisis se utilizó la metodología de Dubois et al., (1956); se tomaron 1 mL de sobrenadante semi purificado y se agregó 0.5 mL de fenol al 5% seguido de 3.5 mL de  $H_2SO_4$  concentrado; los tubos de ensayo fueron agitados y después de 30 min se leyó su absorbancia a 480 nm. La curva de calibración fue realizada con glucosa 1mM.

### 7.8.2. Lípidos

Para esta determinación se utilizó la técnica de Pruthi y Cameotra (1997); se realizó una extracción líquido-líquido, utilizando 10 mL de sobrenadante semi purificado con un volumen similar de éter etílico, el extracto obtenido fue colocado en un rotavapor marca Büchi modelo R114 con baño maría a 60°C y a vacío con la finalidad de eliminar el solvente residual y cuantificar el líquido o sólido resultante.

### 7.8.3. Proteínas

Para conocer el contenido de proteínas del BS se utilizó la metodología de Bradford et al., (1976), en la cual se tomaron 300 µL de sobrenadante semi purificado y se disolvieron con 1.2 mL de solución salina al 85% y 1.5 mL de NaOH 0.1N, esta solución se homogenizó y se colocó en baño María a 85°C durante una hora.

Una vez concluida la hora, se tomaron 0.5 mL de muestra y 0.5 mL de azul de Commasie en un tubo de ensayo de 15 mL el cual se puso en vórtex durante 1 minuto para homogenizar la mezcla, pasado este tiempo se leyó en el espectrofotómetro a 595 nm. La curva de calibración fue realizada con albúmina.

### 7.8.4. Determinación de la naturaleza iónica del surfactante

Los surfactantes pueden ser de naturaleza catiónica, aniónica o no iónicos, una manera indirecta de evaluar su naturaleza es mediante el desarrollo del microorganismo en agar azul (Čipinytė et al., 2011), del cual sus componentes se muestran en la tabla 7.3

**Tabla 7.3** Componentes del medio de cultivo de agar azul

<b>Componente</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
Agar PDA	39
Azul de metileno	0.013
CTAB	0.52

Esta prueba se considera positiva cuando el microorganismo se desarrolla en el medio y genera un halo alrededor de la colonia; lo cual indica que el bioproducto es de naturaleza aniónica.

#### **7.8.5. Espectrometría de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR)**

El biosurfactante parcialmente purificado fue analizado con un espectrómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR), marca Nicolet equipado con ATR y con accesorio para sólidos, con intervalo de lectura desde  $650\text{ cm}^{-1}$  y hasta  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras fueron preparadas mediante su dispersión en KBr de calidad espectrofotométrica.

#### **7.9 Evaluación de la capacidad antimicrobiana del BS**

Se sabe que los BS son capaces de actuar como antibióticos, por lo que esta actividad fue probada utilizando las cepas *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida* las cuales fueron desarrolladas en agar E.M.B y en agar cetrimida respectivamente.

Dichos microorganismos fueron sembrados en relaciones 1:1, 1:2 y 1:3 de agar nutritivo-BS.

##### **7.9.1 Aplicación del BS en un suelo contaminado con *E. coli***

A un suelo proveniente de la zona chinampera contaminado con *E. coli* se le agregó una cantidad similar de BS para tener una relación 1:1 y se agitó vigorosamente en un agitador orbital durante 1 h. Este suelo fue repartido en varias botellas serológicas de 125 mL a las cuales se les agregó 10 g de suelo; las botellas fueron diariamente aireadas con un flujo de  $130\text{ mL/min}$  y la humedad del sistema se mantuvo a un 80%. Tres botellas fueron extraídas cada 2 días para cuantificar la cantidad de *E. coli* presente en el sistema.

De cada botella se tomó 1 g de suelo en base seca y se diluyó en 9 mL de solución salina 0.85 % ( $10^{-1}$ ), se hicieron las diluciones necesarias para poder realizar un conteo de la población mediante la prueba de microgota; estas diluciones fueron incubadas en agar E.M.B.

## Fase II

### 7.10 Caracterización fisicoquímica del suelo a utilizar

El suelo (suelo modelo) utilizado provino de una chinampa con geolocalización N 19° 16' 24.9", W 99° 05' 29.9". La caracterización del suelo para determinar el contenido de carbono, materia orgánica, nitrógeno y fósforo, así como pH y conductividad se realizó conforme a la norma NMX-021 (Secciones 7.10.2 a 7.10.5).

Todos los experimentos y evaluaciones se realizaron por triplicado, reportándose la media y la desviación estándar.

#### 7.10.1 Preparación del suelo

El suelo muestreado se secó a temperatura ambiente en un invernadero con temperatura promedio de 32–35°C, durante el día y humedad relativa promedio de 80–85%, respectivamente durante 3 días.

Pasado este tiempo el suelo se pasó por un tamiz de malla 10 (apertura de 2 mm) y se colocó en una cubeta para sus análisis posteriores.

#### 7.10.2 Determinación de pH y conductividad

La medición de pH y conductividad eléctrica (CE) se realizó haciendo una dilución 1:5 (suelo seco: agua desionizada). Esta solución fue agitada durante 10 min en un agitador magnético, posteriormente fue filtrada y finalmente al líquido resultante se le evaluó el pH y la CE con ayuda de un multiparamétrico marca HANNA modelo HI9828.

La conductividad fue calculada mediante la ecuación 2.

$$CE = 7.351 CE_{1/5} - 0.568 \dots \dots \dots \text{Ec. 2}$$

Donde  $CE_{1/5}$  es el valor de la conductividad eléctrica en dS/m reportado en el equipo.

Si la muestra se encuentra a una temperatura diferente a 25 °C se debe hacer una corrección, utilizando la ecuación 3.

$$CE = CE_t * f_t \dots\dots\dots Ec. 3$$

Donde:

CE<sub>t</sub>: Es el valor de conductividad eléctrica calculado

f<sub>t</sub>: Factor de corrección (Se obtiene de tablas)

### 7.10.3 Cuantificación de carbono y materia orgánica

La cuantificación de carbono orgánico (C<sub>org</sub>) y materia orgánica (MO) se realizó mediante la calcinación de un gramo de suelo seco, a 350 °C durante 8 h; la diferencia de peso en los crisoles indicó el % MO y está dada por la ecuación 4.

$$MO (\%) = \left[ \frac{m_1 - m_2}{m_1} \right] * 100 \dots\dots\dots Ec. 4$$

Donde:

m<sub>1</sub>: Masa inicial (g).

m<sub>2</sub>: Masa final (g).

Para conocer el % C<sub>org</sub> el valor de la materia orgánica se debe dividir entre 1.724. (Andrades 2012)

### 7.10.4 Cuantificación de nitrógeno total

La determinación de nitrógeno total (N total) se realizó por el método de Microkjendalsh con la ayuda de un digestor marca FOSS modelo TECATOR 20 y un destilador marca BÜCHI modelo K-314, titulando la muestra con HCl 0.01 N. El N total (%) esta dado por la ecuación 5:

$$N \text{ total } (\%) = \left[ \frac{(V_2 - V_1) * 14 * N}{m * \left(\frac{m_s}{100}\right)} \right] * 100 \dots\dots\dots Ec. 5$$

Donde:

N total (%): Nitrógeno total en %

V<sub>2</sub>: Volumen de HCl gastado en la muestra (mL)

V<sub>1</sub>: Volumen de HCl gastado en el blanco (mL)

N: Normalidad del HCl (meq/mL)

m: Masa de la muestra (mg)

m<sub>s</sub>: Masa de la muestra seca (mg)

### 7.10.5 Determinación de fósforo soluble

El método para la determinación de fósforo dependió del pH del suelo; ya que este fue un suelo alcalino (pH > 7), se utilizó el método de Olsen, leyendo las muestras en un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo UV-1800. La cantidad de fósforo se determinó por la ecuación 6.

$$P \left( \frac{mg}{kg} \right) = CC * \frac{V_i}{p} * \frac{V_f}{a} \dots\dots\dots Ec. 6$$

Donde:

P (mg/kg): Es la cantidad de fósforo soluble presente en el suelo

CC: mg/L de fósforo en la solución. Se obtiene interpolando en la curva patrón.

V<sub>i</sub>: Volumen de solución extractora adicionada (mL).

P: Peso de la muestra seca (g).

V<sub>f</sub>: Volumen final de la muestra (mL).

a: Alícuota de la muestra empleada para la cuantificación (mL).

### 7.11 Preparación del suelo artificial

Para conocer la cantidad máxima de adsorción de endosulfán en el suelo se realizaron isotermas de adsorción (Freundlich y Langmuir); sin embargo, el suelo no fue contaminado con una concentración mayor a 1 mg/kg a pesar de que tuviera la capacidad de absorber más, puesto que no se tienen registros de suelos con mayores cantidades de endosulfán.

El endosulfán utilizado fue granulado marca GOWAN, el cual se diluyó en hexano para

hacer una solución madre de 10 mg/L. A partir de esta solución se hicieron diluciones para los diferentes puntos de las isotermas (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/kg).

La solución con la concentración seleccionada fue adicionada al suelo en una relación 1:1 y el sistema fue agitado vigorosamente durante toda la noche; posteriormente la concentración fue analizada como se indica en la sección 7.12.

### **7.12 Determinación de plaguicidas en suelo**

Para realizar esta determinación, el suelo fue secado y tamizado con un tamiz de malla 10 (apertura de 2 mm) y utilizando un mortero, para romper los gránulos que no lograron pasar de primera instancia en el tamiz.

La extracción de plaguicida se realizó siguiendo el procedimiento de la EPA 3546 en un equipo de microondas, marca CEM modelo MARS-Xpress, donde en cada tubo se mezclaron 0.5 g de suelo con 0.75 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se adicionaron 6.5 mL de hexano-acetona (1:1 v/v).

Después de la extracción, se recolectó el líquido extraído y se vertió en una columna con florisil con la finalidad de quitar el disolvente residual.

El análisis de plaguicidas organoclorados (POCs) se realizó por el método de la EPA 8081B mediante cromatografía de gases (CG) con detector de captura de electrones (ECD). Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Varian modelo CP-3380, con una fuente de alimentación de Ni, columna capilar Varian (15 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 mm de espesor de la tapa CP-Sil 5CB) y nitrógeno como gas acarreador a 20 psi.

Las condiciones cromatográficas fueron: inyector: 200 °C; detector: 300 °C; columna con una temperatura inicial de 100°C por 1 min; seguido de una rampa de 4°C / min hasta 176°C y después de 6 min se colocó una rampa de 2°C / min hasta 192°C, finalizando con una rampa de 4°C / min hasta 230°C.

Los estándares de endosulfán  $\alpha$ ,  $\beta$ , sulfato, mono alcohol, lactona y éter fueron inyectados previamente para identificar los picos resultantes del cromatograma.

### **7.13 Selección del cultivo agrícola a utilizar**

Se contaminó el suelo con 1 mg/kg de endosulfán para germinar 4 semillas diferentes: frijol bayo (*Phaseolus leptostachyus*), chícharo (*Pisum sativum*), coliflor (*Brassica oleracea var. Botrytis*) y lechuga italiana (*Latuca sativa*); después de uno y 2 meses (dependiendo del cultivo) se evaluó la concentración de endosulfán y sus metabolitos presentes en la raíz, el tallo y la hoja.

La plántula con una mayor capacidad de adsorción del plaguicida y cuyo crecimiento fue el más rápido, se utilizó para evaluar la fitotoxicidad posterior al proceso de biorremediación.

A todos los cultivos con endosulfán y el control (sin endosulfán) se les determinó el índice de germinación, elongación radicular y biomasa, para evaluar el efecto del plaguicida en el desarrollo del cultivo.

Todos los cultivos fueron desarrollados en maceteros de 20 cm con 40 g de suelo, colocados en un invernadero con temperatura promedio de 32–35°C, durante el día y humedad relativa promedio de 80–85% y regados con 20 mL de agua corriente cada 2 días.

### **7.14 Determinación de plaguicidas en plántulas**

Para determinar la concentración de endosulfán y sus metabolitos en las plantas, estas se secaron en horno a 60°C durante toda la noche. Una vez secas se molieron para tener 0.5 g de muestra la cual se mezcló con 0.75 g de sulfato de sodio anhidro para realizar la extracción de plaguicidas en el microondas de la misma manera que el suelo (Sección 7.12).

### **7.15 Determinación de plaguicidas organoclorados en vegetales desarrollados en las chinampas de Xochimilco**

Para la determinación de plaguicidas organoclorado en vegetales de la zona chinampera, se utilizaron lechugas de una chinampa que utiliza agroquímicos y se encuentra en proceso de transición de agricultura tradicional a orgánica.

Los cultivos se secaron en un invernadero con temperatura promedio de 32–35°C, durante el día y humedad relativa promedio de 80–85%, respectivamente durante 3 días; y la extracción del plaguicida se realizó de la misma manera que en las plántulas previas (Sección 7.14).

### **7.16 Diseños de experimentos propuestos para el proceso de biorremediación**

Con la finalidad de comprobar el efecto del BS en la remoción de endosulfán, y del suelo cultivado, se establecieron 5 tratamientos y un control.

El suelo con endosulfán se preparó de la misma forma que en la sección 7.11 con una concentración de 1 mg/kg.

Para los tratamientos de biorremediación dos inóculos fueron utilizados: el inóculo CMCN (desarrollado en la sección 7.1) y el microorganismo *P. crustosum* bajo las condiciones seleccionadas de la sección 7.5.

Los 5 tratamientos fueron:

- Tratamiento 1: suelo contaminado y adicionado con 1 % w/w del inóculo CMCN.
- Tratamiento 2: suelo contaminado con aplicación únicamente de BS en una relación 1:1.
- Tratamiento 3: suelo contaminado con la adición de BS en una relación 1:1 y 1% w/w del inóculo CMCN.
- Tratamiento 4: suelo contaminado y adicionado con 1% w/w de *P. crustosum*.
- Tratamiento 5: suelo contaminado con la adición de BS en una relación 1:1 y 1% w/w del inóculo *P. crustosum*.

Además, se tuvo un control, que consistió en el suelo contaminado sin ningún tratamiento para evaluar la degradación natural del contaminante.

El proceso de biorremediación se llevó a cabo durante dos meses en botellas serológicas de 125 mL con 10 g de suelo; los sistemas se mantuvieron con una humedad constante del 80% y fueron diariamente aireados con un flujo de 130 mL/ min durante 5 minutos.

Los días de muestreo fueron 0, 7, 14, 21, 30 y 60. En cada tiempo de muestreo 3 botellas fueron extraídas para realizar la cuantificación de plaguicidas respectiva.

Finalmente, una vez seleccionado el tratamiento con mayor remoción, se realizó un lote grande de este suelo biorremediado, para evaluar sus propiedades fisicoquímicas con la finalidad de apreciar si el proceso de biorremediación también las mejoro y sembrar el cultivo seleccionado en la sección 7.13.

#### **7.17 Fitotoxicidad en plantas germinadas en suelo biorremediado**

De acuerdo con los resultados obtenidos en la sección 7.16, frijoles bayos (*Phaseolus leptostachyus*) se cultivaron en un suelo que estaba siendo simultáneamente biorremediado con el inoculo CMCN y el microorganismo *P. crustosum*; así como en un suelo previamente BR con los mismos inóculos, para comparar ambos tratamientos y apreciar en cual la traslocación de plaguicida fue menor y las plántulas tuvieron un mejor desarrollo.

Además, se tuvo un sistema control que consistió en los frijoles desarrollados en el suelo modelo (libre de plaguicidas).

Después de 2 meses de desarrollo, a las plántulas se les determinó el índice de germinación, la longitud y peso de raíz y parte aérea como parámetros fitotoxicológicos.

Finalmente, se determinó la concentración de endosulfán y sus metabolitos en raíz, tallo y hoja, esta cuantificación se realizó de acuerdo con lo descrito en la sección 7.14.

### Fase III

#### 7.18 Preparación de los sistemas para evaluación de estrés abiótico

Una vez observado que las plantas de *P. leptostachyus* desarrolladas en los suelos previamente biorremediados tenían mejores propiedades morfológicas, 6 sistemas fueron determinados para evaluar el estrés abiótico, que la salinidad y el endosulfán tenían sobre el cultivo, así como el efecto endófito que pudieran tener los inóculos CMCN y *P. crustosum* sobre el vegetal. Los sistemas fueron:

- Suelo control: Suelo modelo sin ningún tipo de tratamiento.
- Suelo control PC: Suelo modelo bioaumentado con 1% w/w del inóculo *P. crustosum*.
- Suelo control CMCN: Suelo control bioaumentado con 1% w/w del inóculo CMCN.
- Suelo con endosulfán: Suelo control contaminado con 1 mg/kg de endosulfán.
- Suelo BR PC: Suelo con endosulfán después de un mes de biorremediación con el inóculo *P. crustosum*.
- Suelo BR CMCN: Suelo con endosulfán después de un mes de biorremediación con el inóculo CMCN.

Todos los cultivos se desarrollaron durante un mes, en semilleros de 10 cm, con 20 g de suelo, colocados en una cámara de germinación a 28 - 18 °C (día y noche), humedad relativa 60-65% al día y 95-100% en la noche con un fotoperiodo de 14 horas de luz.

#### 7.19 Medición de parámetros de crecimiento

Una vez germinadas las semillas, cada 3° día se cuantificó la longitud de la parte aérea con una regla y el ancho del tallo con un capilar digital marca Mitutoyo Absolute modelo CD-20DCX durante un mes; también fue cuantificado el número de hojas en todos los sistemas.

#### 7.20 Parámetros de crecimiento finales

Después de un mes de desarrollados los cultivos se cuantificó el índice de germinación, la longitud de raíz, parte aérea, ancho de tallo y número de hojas.

También se cuantificó la biomasa fresca y seca tanto de la parte aérea como de la raíz.

Para tener biomasa seca, se seleccionaron 10 plantas de cada sistema al azar, y se dejaron secar durante 48 h a 60°C, hasta que se tuvo peso constante.

### 7.21 Conservación de material fresco para análisis posteriores

Con la finalidad de tener material fresco para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos, osmolitos, antioxidantes enzimáticos y no enzimáticas, así como marcadores de estrés oxidativo; el día de muestreo se tomaron en tubos eppendorf entre 0.05 y 0,1 g de material fresco y se conservaron en nitrógeno líquido para posteriormente guardar en el ultracongelador de -80°C, hasta su uso.

### 7.22 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

La determinación de clorofila se realizó siguiendo la metodología de Lichtenthaler & Wellburn (1983). Para esto se utilizaron 5 viales con material vegetal conservados en el punto 7.21 de cada sistema; a los cuales se les adicionó 1 mL de acetona al 80% fría; los tubos se dejaron en agitación toda la noche a 4°C; y pasado ese tiempo se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C durante 10 minutos.

Del sobrenadante se tomaron 100 µL y se diluyeron en 900 µL de acetona fría 80% para posteriormente leer en el espectrofotómetro marca VWR modelo UV 1600 PC a 470, 646 y 663 nm; las concentraciones de los pigmentos fueron calculadas utilizando las ecuaciones 7-9:

$$Chl\alpha \left( \frac{\mu g}{mL} \right) = 12.21 Abs\ 663 - 2.81 Abs\ 646 \dots\dots\dots Ec.7$$

$$Chl\beta \left( \frac{\mu g}{mL} \right) = 20.13 Abs\ 646 - 5.03 Abs\ 663 \dots\dots\dots Ec. 8$$

$$Carotenoides \left( \frac{\mu g}{mL} \right) = \frac{1000 Abs\ 470 - 3.27 Chl\alpha - 104 Chl\beta}{227} \dots\dots\dots Ec.9$$

Donde:

Chl $\alpha$ : clorofila  $\alpha$   
Chl $\beta$ : clorofila  $\beta$   
Abs: absorbancia

Posteriormente se realizaron la corrección de los cálculos en función al peso seco de las muestras y los resultados se reportaron como el promedio  $\pm$  error estándar.

### **7.23 Cuantificación de iones (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>)**

Para la cuantificación de iones se llevó a cabo la metodología de Weimberg (1987) en un fotómetro de flama para los iones Na<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup> y K<sup>+</sup> mientras que para los iones de Cl<sup>-</sup> se utilizó un analizador de cloro.

Para llevar a cabo el análisis se tomaron muestras secas entre 0.05 y 0.1 g de raíz, hojas y tallo, las cuales se trituraron y fueron diluidas con 1 mL de agua miliQ. Estas muestras se pusieron a ebullición a 95°C durante una hora y pasado ese tiempo se dejaron en agitación toda la noche.

Al día siguiente a todas las muestras se les adicionó 1 mL de agua miliQ, posteriormente fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante obtenido fue cuantificado en el fotómetro de flama marca Jenway modelo PFP7 para los iones Na<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup> y K<sup>+</sup>. Mientras que, para los iones de Cl<sup>-</sup> se utilizó un analizador de cloro marca Merck modelo Spectroquant Nova 60.

### **7.24 Cuantificación de osmolitos (prolina y azúcares)**

#### **7.24.1 Cuantificación de prolina**

La cuantificación de prolina se realizó mediante el método espectrofotométrico descrito por Bates et al., (1973).

Para realizar esta medición se utilizaron entre 0.05 y 0.1 g de muestras secas, las cuales fueron colocadas en tubos Eppendorf de 2 mL y para posteriormente fueron trituradas. Las

muestras fueron extraídas con 2 mL de ácido sulfosalicílico al 3%; y centrifugadas a 13,000 rpm durante 15 min.

Se tomaron 0.5 mL de sobrenadante y se le adicionó 0.5 mL de ninhidrina ácida y 0.5 mL de ácido acético glacial. Esta mezcla se puso a ebullición a 98°C durante una hora. Después de este tiempo, los tubos se pusieron en hielo durante 10 min, para posteriormente adicionarles 1 mL de tolueno. La mezcla se agitó durante 1 min, tomando la fase superior para cuantificar su absorbancia en el espectrofotómetro a 520 nm; una solución de prolina 2 nM fue utilizada como estándar.

#### **7.24.2 Preparación de extracto para MDA, compuestos fenólicos, flavonoides y azúcares**

Esta etapa se realizó con los cultivos secos obtenidos en la sección 7.20, y los cultivos frescos de la sección 7.21.

Para esto se pesaron entre 0.05 y 0.1 g de muestras, se trituraron y diluyeron con 2 mL de metanol al 80%. El extracto se dejó en agitación toda la noche, pasado este tiempo las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue separado en viales de 500  $\mu$ L para conservarlo en nitrógeno y utilizarlo hasta la realización de los análisis correspondientes.

#### **7.24.3 Cuantificación de azúcares**

La cuantificación de azúcares se realizó con el método de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956). En tubos de vidrio de 15 mL se colocaron 50  $\mu$ L del extracto obtenido en la sección 7.24.2, con 450  $\mu$ L de agua miliQ. A cada tubo se le añadió 0.5 mL de fenol al 5% y 2.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; los tubos se dejaron reposar 30 min y posteriormente se leyeron en el espectrofotómetro a 490 nm. Glucosa 1 mM fue utilizada como estándar.

### **7.25 Cuantificación de marcadores de estrés oxidativo (MDA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

#### **7.25.1 Cuantificación de malondialdehído (MDA)**

La determinación de malondialdehído se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Taulavori et al., (2001).

En tubos de vidrio se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  del extracto obtenido en la sección 7.24.2 con 400  $\mu\text{L}$  de metanol 80% y se adicionaron 600  $\mu\text{L}$  del reactivo TCA+TBA.

En otros tubos se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  del extracto obtenido en la sección 7.24.2, 400  $\mu\text{L}$  de metanol 80% y 600  $\mu\text{L}$  del reactivo TCA 20%.

Posteriormente todos los tubos se pusieron en baño María durante 15 min; pasado este tiempo se introdujeron durante 5 min en una tina con hielo para detener la reacción.

Finalmente, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm, 4°C y 10 min, y el sobrenadante obtenido se leyó en el espectrofotómetro a 440, 532 y 600 nm.

La concentración de MDA se calculó utilizando la ecuaciones 10-12:

$$A = Abs\ 532 - Abs\ 600 - (Abs\ 532_{Solo\ TCA} - Abs\ 600_{Solo\ TCA}) \dots\dots\dots Ec. 10$$

$$B = (Abs\ 440 - Abs\ 600)0.0571 \dots\dots\dots Ec.11$$

$$MDA \left( \frac{nmol}{mL} \right) = \left( \frac{A-B}{157000} \right) 10^6 \dots\dots\dots Ec. 12$$

### 7.25.2 Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Para la realización de este análisis se utilizó el método de Loreto & Velikova (2001) con algunas modificaciones. Se tomaron 0.5 g de muestra fresca, la cual fue triturada y extraída en 1.5 mL de reactivo TCA al 0.1 %; para posteriormente centrifugarla a 13,000 rpm, 15 min y 4°C.

Del sobrenadante obtenido se tomaron 500  $\mu\text{L}$  que se diluyeron con 500  $\mu\text{L}$  de buffer Tris 1 M y 1 mL de solución KI, esta mezcla se cuantificó en el espectrofotómetro a 390 nm, durante un minuto, anotando la variación de la absorbancia cada 10 seg. Una solución de 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue utilizada como estándar.

## **7.26 Antioxidantes no enzimáticos**

### **7.26.1 Cuantificación de compuestos fenólicos**

La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó por el método descrito por Blainski et al., 2013 por la reacción con el reactivo Folin Ciocalteu, para ello se utilizó el extracto obtenido en la sección 7.24.2.

En tubos de vidrio de 15 mL se colocaron 50  $\mu$ L del extracto con 50  $\mu$ L de metanol 80% y 1.9 mL de agua mili Q. A esta disolución se le adicionó 100  $\mu$ L de reactivo Folin Ciocalteu y se homogenizó en un vórtex. Posteriormente se adicionaron 350  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 15 % y se dejó reposar en la oscuridad durante 90 min, pasado ese tiempo se leyó en un espectrofotómetro marca VWR modelo UV 1600 PC a 765 nm, utilizándose ácido gálico 0.2 nM como estándar.

### **7.26.2 Cuantificación de flavonoides**

La cuantificación de flavonoides se realizó por el método descrito por Zhishen et al., (1999). En tubos Eppendorf se colocaron 50  $\mu$ L del extracto obtenido en la sección 7.24.2 y se adicionaron 450  $\mu$ L de agua mili Q. Posteriormente se adicionaron 30  $\mu$ L de  $\text{NaNO}_2$  al 5%, los tubos se agitaron en el vórtex y se dejaron reposar durante 5 min. Después de este tiempo, se adicionaron 30  $\mu$ L de  $\text{AlCl}_3$  al 10 %, nuevamente se agitaron los tubos y se dejaron reposar durante 6 min. Finalmente, se adicionaron 200  $\mu$ L de  $\text{NaOH}$  1M y 240  $\mu$ L de agua mili Q, la solución resultante se agitó y leyó en el espectrofotómetro a 510 nm, utilizando catequina 100 mM como estándar.

## **7.27 Antioxidantes enzimáticos**

### **7.27.1 Preparación del extracto**

Para la cuantificación de enzimas y proteínas se realizó un extracto con solución PEB (buffer de extracción) de acuerdo con lo reportado por Gil et al., 2014.

El buffer de extracción estuvo compuesto por: de 20 mM Hepes (pH 7.5), 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.1 % (v/v) Tritón X-100, 0.2 % (w/v) polyvinilpirrolidona, 0.2 % (w/v) polivinilpolipirrolidona, 5 % (v/v) glicerol.

Las muestras se procesaron de la siguiente manera: se pesaron entre 0.05 y 0.1 g de muestra fresca en tubos Eppendorf de 2 mL, estas muestras fueron diluidas en 1 mL de buffer PEB y colocadas en hielo durante 10 minutos. Pasado este tiempo se añadieron 100  $\mu$ L de solución HSB (High Salt buffer) (225 mM Hepes (pH 7.5), 1.5 M KCl, 22.5 mM MgCl<sub>2</sub>), los tubos se agitaron en el vórtex y se colocaron 15 minutos más en hielo.

Concluido el tiempo las muestras fueron centrifugadas a 13,500 rpm, 4°C durante 15 min y el sobrenadante fue colocado en diferentes viales y conservado en nitrógeno líquido para los diferentes análisis.

### **7.27.2 Cuantificación de proteínas**

La determinación de proteínas se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Bradford et al. (1976). En tubos de vidrio se colocaron 30  $\mu$ L de extracto obtenido en la sección 7.27.1, los cuales se diluyeron en 770  $\mu$ L de agua mili Q, y se adicionó 200  $\mu$ L de reactivo de Comassie. Las muestras se dejaron reposar 30 minutos en la oscuridad y finalmente se leyeron a 595 nm utilizando una solución de Seroalbúmina bovina (BSA) de 1 mg/mL como estándar.

### **7.27.3 Cuantificación de superóxido dismutasa (SOD)**

La actividad SOD fue determinada por la inhibición de nitroazul de tetrazolio (NBT) de acuerdo con la metodología establecida por Beyer & Fridovich, 1987. Para esto un mix fue preparado de la siguiente manera: 500  $\mu$ L de KPO<sub>4</sub> buffer con 2.5  $\mu$ L de tritón, 10  $\mu$ L de reactivo EEB, 368.9  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O mili Q y 99  $\mu$ L de metionina (por muestra). A este mix se le adicionaron 5.8  $\mu$ L de reactivo NBT y 4.8  $\mu$ L de riboflavina y finalmente 10  $\mu$ L extracto obtenido en la sección 7.27.1. Las muestras se pusieron durante 10 min en luz UV y se leyeron a 560 nm.

#### **7.27.4 Cuantificación de catalasas**

Esta actividad enzimática fue cuantificada de acuerdo con la metodología descrita por Aebi, (1984), siguiendo la disminución del consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm durante un minuto.

Para esto, a tubos Eppendorf de 2 mL se le adicionaron 750  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , con 80  $\mu\text{L}$  de reactivo EEB y 20  $\mu\text{L}$  del extracto obtenido en la sección 7.27.1. Posteriormente 50  $\mu\text{L}$  de solución TRIS y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM fueron adicionados. Las muestras se agitaron y se leyeron durante un minuto registrando la disminución de la absorbancia.

#### **7.27.5 Cuantificación de ascorbato peroxidasa**

La actividad enzimática del ascorbato peroxidasa fue cuantificada siguiendo la metodología de Nakano & Asada, (1981). Cuantificando la disminución de la longitud de onda de la reacción que sufre la oxidación del ascorbato a 290 nm.

Para esto, en tubos eppendorf se colocaron 1 mL de ascorbato 1 mM con 200  $\mu\text{L}$  de EDTA y 300  $\mu\text{L}$  de reactivo EEB con 20  $\mu\text{L}$  de extracto obtenido en la sección 7.27.1 y 480  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 mM. Las muestras se leyeron durante un minuto registrando la disminución de la absorbancia cada 10 segundos.

#### **7.27.6 Cuantificación de glutatión reductasa**

Para medir la actividad del glutatión reductasa se consideró la oxidación de NADPH realizada por la enzima mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm como lo describe Connell & Mullet, (1986).

Para esto se realizó un mix con 5 mL de solución HEPES 100 mM, 100  $\mu\text{L}$  de EDTA 1 mM, 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  y 250  $\mu\text{L}$  de solución GSSG 0.5 mM. Esta mezcla se aforó hasta 50 mL con agua mili Q.

Para la preparación de cada muestra se pusieron 110  $\mu\text{L}$  del mix con 480  $\mu\text{L}$  de reactivo EEB, 20  $\mu\text{L}$  del extracto obtenido en la sección 7.27.1, 380  $\mu\text{L}$  de agua mili Q y finalmente

10  $\mu\text{L}$  de NADPH, esta mezcla fue agitada y se realizó una primera lectura en el espectrofotómetro a 340 nm al tiempo 0.

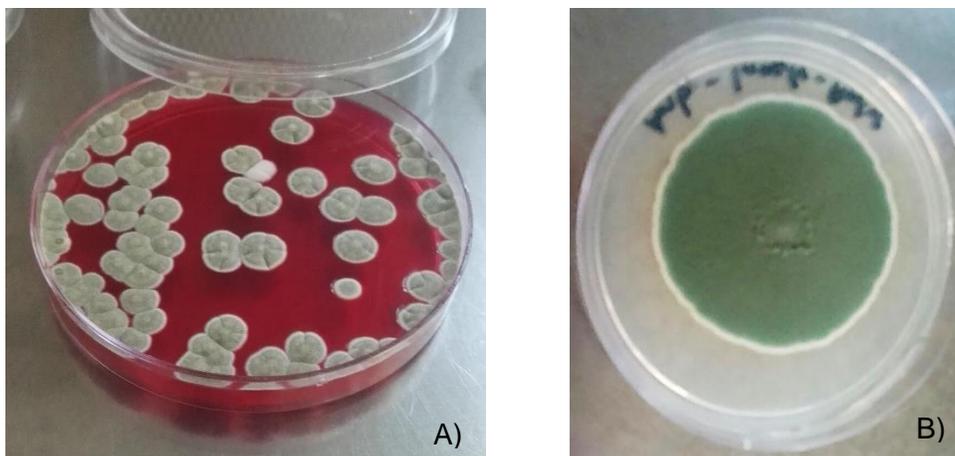
Las muestras se incubaron a 25 °C durante 25 min y se realizó una 2da lectura, en el espectrofotómetro. La diferencia entre ambos valores se consideró para cuantificar la actividad enzimática.

## 8. Resultados y discusión

### FASE I

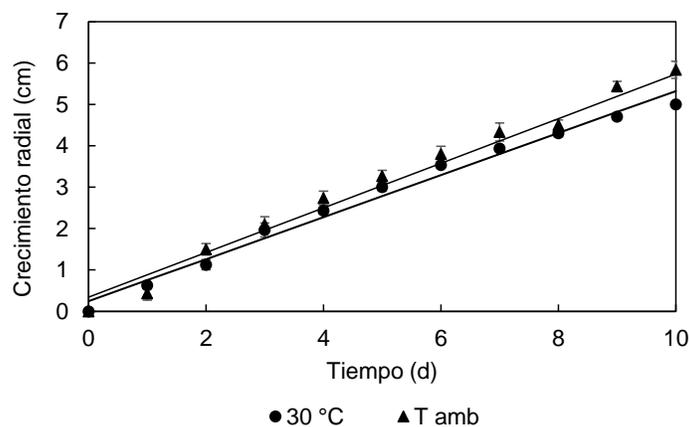
#### 8.1 Caracterización del consorcio microbiano

El consorcio microbiano proveniente de un residuo cítrico fue diluido en solución salina al 85% y cultivado en medio PDA y en medio PDA con rosa de Bengala con la finalidad de tener un cultivo mono esporico, apreciándose en ambos casos la formación de un hongo verde denominado cepa AL-L44 (Fig. 8.1).



**Fig. 8.1** Hongo AL-L44 aislado y cultivado en PDA proveniente del residual cítrico. A) PDA con rosa de Bengala. B) PDA

De una colonia aislada en PDA con rosa de Bengala, se realizó una cosecha de esporas con una concentración de  $1 \times 10^{-6}$ , de la cual posteriormente se tomaron  $10 \mu\text{L}$  para inocular en una caja con PDA y cuantificar el crecimiento radial del microorganismo durante 10 días, tanto a temperatura ambiente ( $27^\circ\text{C}$  en promedio) como a  $30^\circ\text{C}$  apreciándose un crecimiento lineal en ambos casos y una diferencia de 0,5 cm entre ambas temperaturas (Fig. 8.2). Cabe mencionar que el microorganismo también se incubó a  $35^\circ\text{C}$  sin que se apreciará crecimiento.

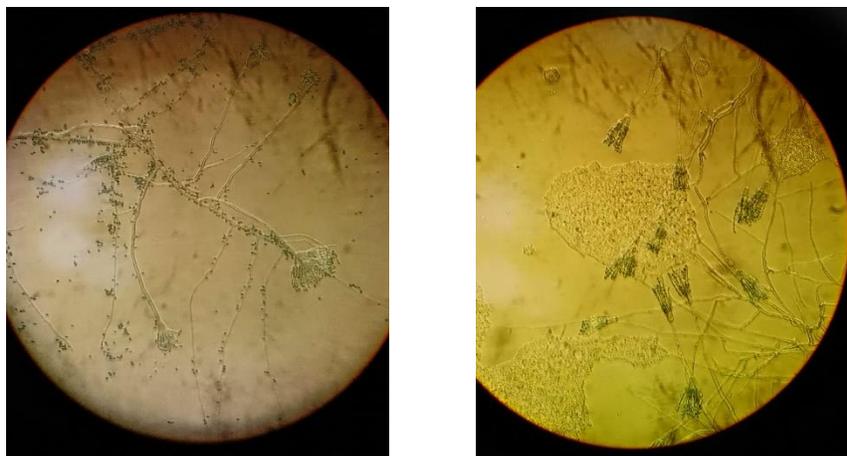


**Fig. 8.2** Evaluación del crecimiento radial del hongo AL-L44 cultivado en PDA, durante 10 días a diferentes temperaturas.

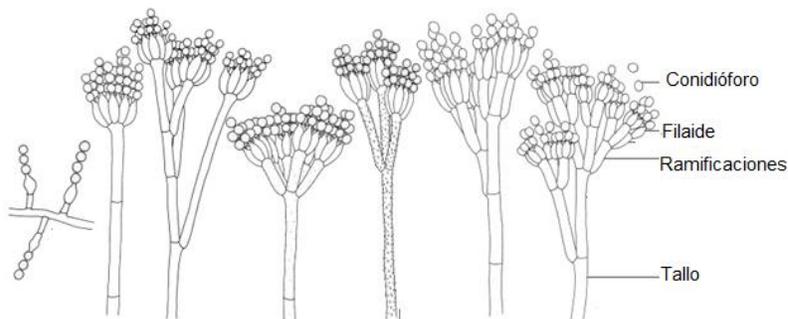
A este hongo se le realizó un micro cultivo, el cual fue teñido y observado en un microscopio óptico (Fig. 8.3), encontrándose la morfología característica del grupo *Penicillium*, en el cual los conidióforos jugaron un papel importante en la identificación micromorfológica.

Para el género *Penicillium* los conidióforos pueden tener patrones simples o muy complejos con múltiples niveles de ramificación resultando en patrones globales simétricos o asimétricos; los conidióforos monoverticulados tienen una espiral terminal de fiálide y en algunas especies, la célula terminal del conidióforo está ligeramente hinchada o vesiculada (Fig.8.4). También se ha visto que los conidióforos pueden tener un patrón de ramificación de simple a complejo con numerosas ramas subterminales (Visagie et al., 2014).

El género *Penicillium* ha sido reportado por su capacidad de desarrollarse en diferentes residuales cítricos (Audesirk et al., 2003) y también ha sido reportado por otros autores como productor de biosurfactantes (Gautman et al., 2014; Yuan et al., 2006; Camargo et al., 2003). En este trabajo, el hongo AL-L44 se obtuvo e identificó en el residuo cítrico bajo condiciones específicas, lo cual le abre un potencial en el área de biorremediación.



**Fig. 8.3** Microcultivo realizado al hongo AL-L44 aislado del residual cítrico, observación en microscopio óptico a 100X.



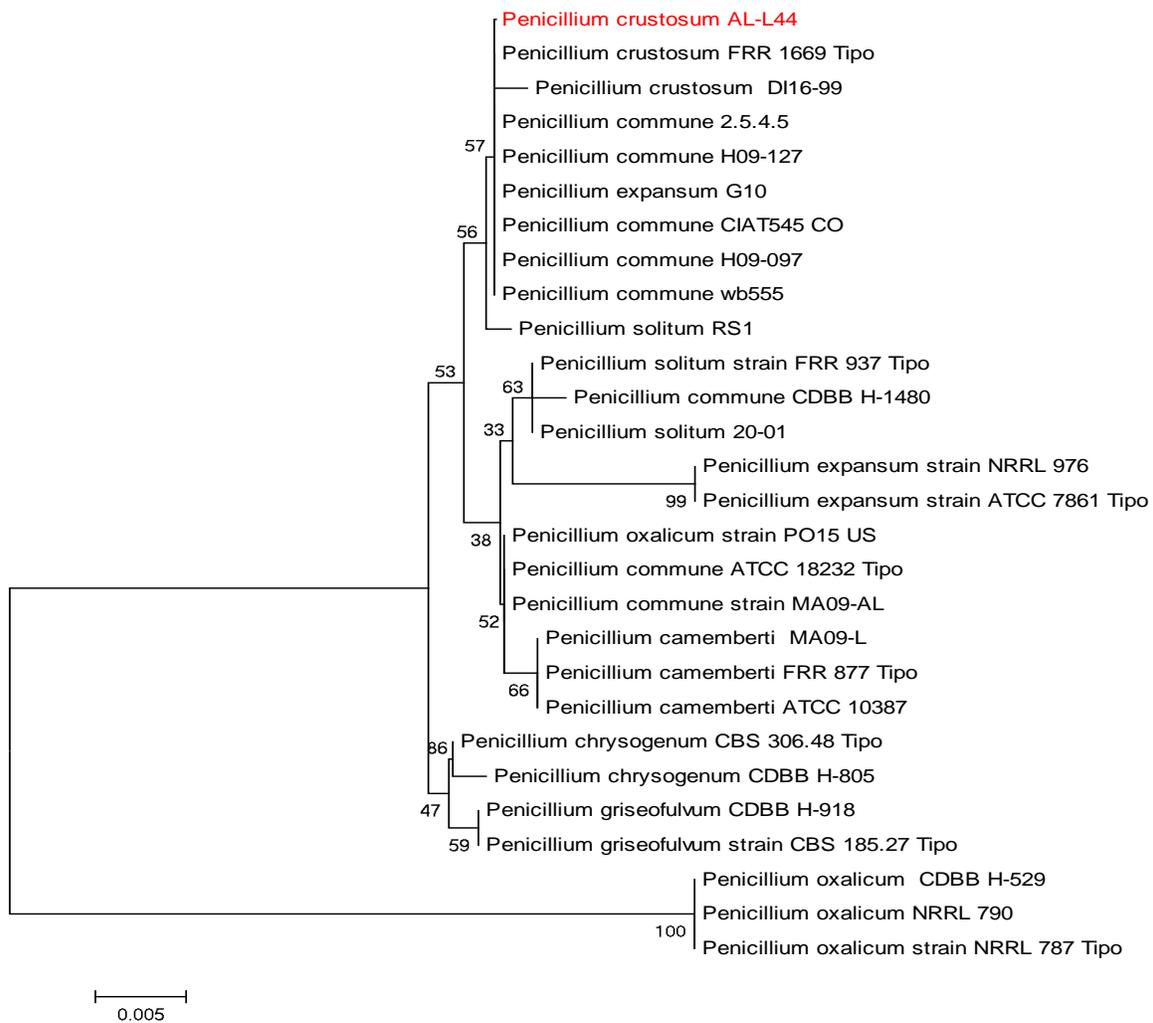
**Fig. 8.4** Morfología característica del grupo *Penicillium*

El análisis de la secuencia del gen 16S-ITS1-106 5.8S-ITS2-26S sugirió que el microorganismo aislado pertenece al género *Penicillium* y subgénero *crustosum* con un 100% de similitud. La secuencia de nucleótidos fue depositada en el GenBank (NCBI) bajo el número de acceso MG009431 (Fig. 8.5).

*Penicillium crustosum* ha sido ampliamente estudiado por la formación de metabolitos secundarios entre los que destacan los penitremos y la roquefortina, utilizados en control biológico puesto que son empleados para el control de plagas, como la chinche grande (*Oncopeltus fasciatus*), el gusano elotero (*Heliothis zea*) y la mosca de la fruta (*Ceratitis capitata*). Estos compuestos, dependiendo de su concentración y del tipo de insecto a controlar, puede inducir la muerte del insecto, regular el crecimiento o la esterilización; así

como tener interferencia en la metamorfosis y otras funciones morfogénicas (Gonzalez et al., 2003).

Sin embargo, hasta el momento este microorganismo no ha sido reportado como productor de biosurfactante, pero se tiene conocimiento que otros subgéneros de *Penicillium* como *chrysogenum* y *citrinum* tienen la capacidad de producir este metabolito (Gautman et al., 2014; Camargo et al., 2003).



**Fig. 8.5** Dendrograma filogenético del hongo AL-L44 aislado de un residuo cítrico.

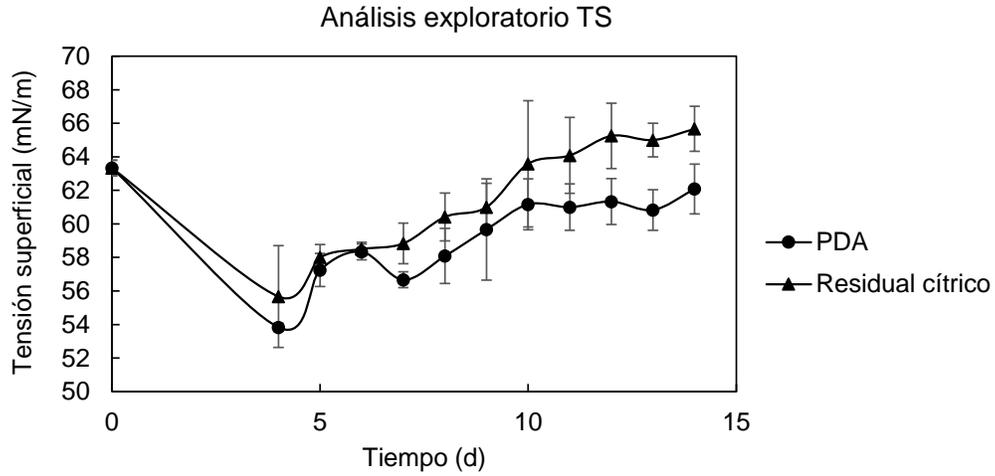
## 8.2 Evaluación preliminar de la producción de BS

Con la finalidad de verificar si el hongo AL-L44 producía biosurfactante, se realizaron 2 estrategias de inoculación en el medio mineral indicado en la sección 7.1. En la primera estrategia se inoculó con el residual cítrico fermentado y en la segunda con el hongo aislado en PDA.

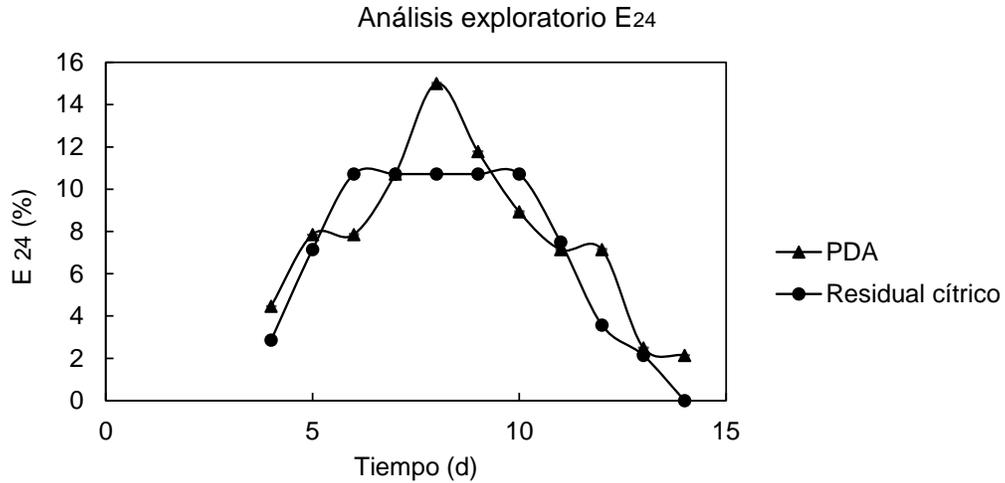
Con estos resultados se pudo observar que la desviación estándar fue mayor con en el inóculo proveniente del residuo cítrico fermentado, probablemente por la presencia de otros microorganismos, entre estas bacterias (Fig. 8.7); los cuales fueron evidenciados en el microscopio y con tinción de Gram (Fig. 8.8). Estos microorganismos pudieron provenir del sustrato (residuo cítrico) utilizado ya que este no se esterilizó para que no perdiera sus propiedades.

En general, con ambos inóculos (residuo cítrico fermentado y hongo aislado) se tuvo un perfil similar de crecimiento del hongo AL-L44, pero se obtuvieron mejores resultados con el inóculo del hongo aislado, con una TS de 53.83 mN/m al cuarto día y una actividad emulsificante de 15% al octavo día.

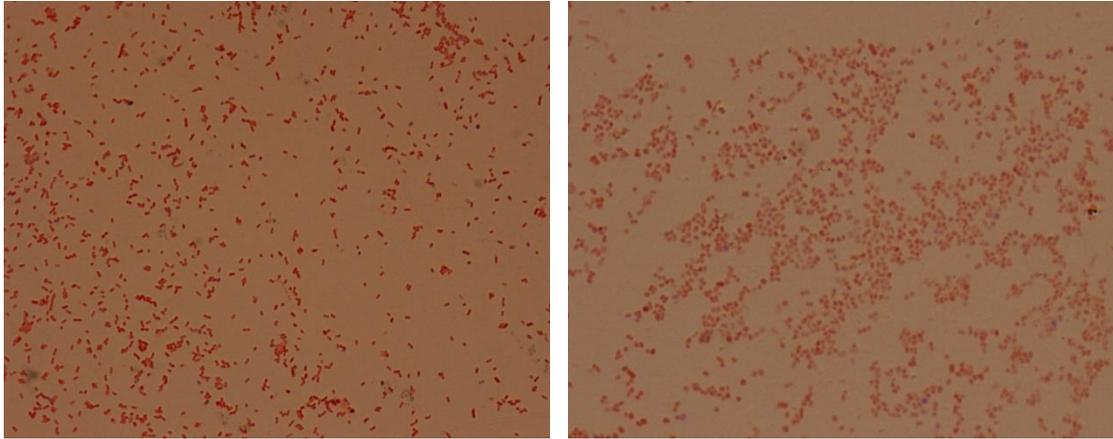
Algunos trabajos con el género *Penicillium* para la producción de biosurfactantes reportan TS de 60.13 mN/m al quinto día (Yuan et al., 2006) y actividades emulsificantes del 80 % con diésel al tercer día (Camargo et al., 2003).



**Fig. 8.6** Comparación de la actividad tensoactiva (tensión superficial) de *P. crustosum* desarrollado en PDA y en un residuo cítrico; cultivado a en un medio mineral a 30 °C y 120 rpm.



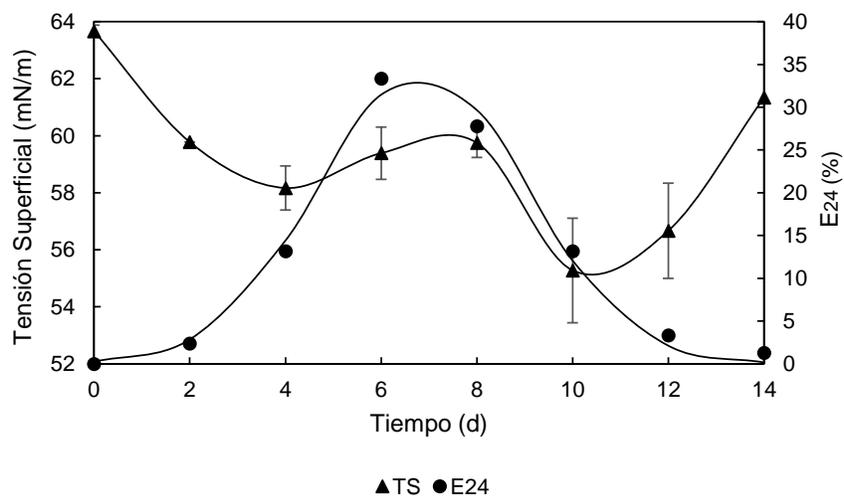
**Fig. 8.7** Comparación de la actividad emulsificante de *P. crustosum* desarrollado en PDA y en un residuo cítrico; cultivado a en un medio mineral a 30 °C y 120 rpm.



**Fig. 8.8** Observación microscópica con tinción de Gram a 100X, del cultivo en medio mineral con un residual cítrico como sustrato, a las 96 horas de cultivo

Después de determinar que el hongo AL-L44 era capaz de reducir la TS y aumentar la  $E_{24}$ , se realizó una prueba confirmativa utilizando el microorganismo proveniente del medio PDA y adicionando ácido tartárico al 10 % con la finalidad de acidificar el medio e inhibir el crecimiento de bacterias. En este caso el BS producido tuvo una mayor actividad emulsificante, con un valor máximo de 33% al 6° día (Fig. 8.9); y la tensión superficial disminuyó a 55.28 mN/m hasta el día 10.

La diferencia en este comportamiento puede estar asociada a 2 situaciones, la primera relacionada con que los hongos tienden a desarrollarse mejor en medios ácidos lo que favorece la producción de ácidos orgánicos (Izcapa-Treviño et al., 2009) y la segunda al tener un medio ácido el desarrollo de bacterias se vio inhibido por lo que no existió una competencia por los nutrientes del medio de cultivo; así que el hongo *P. crustosum* no tuvo que consumir el BS producido como una fuente alternativa.



**Fig. 8.9** Análisis confirmativo de la producción de BS por *P.crustosum* AL-L44 utilizando un medio mineral con un sustrato cítrico como fuente de carbono cultivado a 30 °C y 120 rpm.

### 8.3 Evaluación de diferentes parámetros sobre la producción de BS evaluada como TS y E<sub>24</sub>

Con la finalidad de aumentar la disminución de la TS y la E<sub>24</sub>, se implementó un diseño de experimentos Taguchi L9, para evaluar el efecto de la fuente de carbono y nitrógeno, el pH y la agitación a tres niveles diferentes cada uno (Tabla 7.2). La  $\Delta$ TS y el E<sub>24</sub> fueron evaluadas al 6° y 12° día respectivamente, donde se encontraron los máximos valores, observándose la mayor actividad emulsificante en los tratamientos 2, 5 y 8, los cuales tenían NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno (Tabla 8.1), resaltando el papel importante que juega la fuente de nitrógeno en la producción de BS.

**Tabla 8.1** Resultados del cambio en las propiedades de TS y E<sub>24</sub>, de los cultivos establecidos en el diseño de experimentos Taguchi L9

Tratamiento	$\Delta$ TS al 6° día (mN/m)	E <sub>24</sub> al 12° día (%)
1	10.83 ± 1.50	0.00 ± 0.00
2	12.5 ± 0.33	<b>40.48 ± 0.05</b>
3	12.89 ± 1.00	7.14 ± 0.00
4	18.11 ± 0.63	7.14 ± 0.00
5	11.33 ± 0.54	<b>29.51 ± 0.1</b>
6	<b>26.61 ± 0.50</b>	13.97 ± 0.05
7	13.28 ± 0.21	7.94 ± 0.12
8	15.56 ± 0.31	<b>43.81 ± 0.15</b>
9	17.56 ± 0.08	11.11 ± 0.18

$\Delta$ TS: Diferencial de la tensión superficial / E<sub>24</sub>: Actividad emulsificante

El tipo de fuente de N<sub>2</sub> es un elemento esencial para la formación de proteínas, el crecimiento y producción de enzimas durante el desarrollo del microorganismo (Xia et al., 2013).

Cardoso et al., (2010) apreciaron que cuando se utiliza una fuente inorgánica como en este caso, se produce una mayor cantidad de BS; mientras que, al utilizar una fuente orgánica, se produce una mayor cantidad de células.

Por su parte Abouseoud et al., (2008) evaluaron 3 fuentes de nitrógeno inorgánicas para el cambio de las propiedades del caldo de cultivo de *Pseudomonas fluorescens* las cuales fueron NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>Cl, apreciando que la máxima E<sub>24</sub> se obtenía con NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno.

De los pocos trabajos que se tienen de producción de BS para el género *Penicillium* la mayoría han utilizado fuentes orgánicas como extracto de levadura y malta, así como peptona (Camargo-de-Morais et al., 2003; Yuan et al., 2006; Luna-Velasco et al., 2007), sin

embargo, estos trabajos han presentado únicamente actividad emulsificante o tensoactiva y no ambas como *P. crustosum*.

### 8.3.1 Efecto de las variables evaluadas sobre la actividad emulsificante

Con respecto a la actividad emulsificante, el análisis estadístico del diseño de experimentos (Fig. 8.10), corroboró que la variable más significativa fue la fuente de nitrógeno ( $p < 0.005$ ), seguido de la fuente de C y pH; mientras que la agitación fue la variable menos significativa (Tabla 8.2).

El efecto de la fuente de nitrógeno ya fue ampliamente discutido en la sección anterior (sección 8.3); pero sobre la fuente de carbono no se ha mencionado nada; se sabe que esta tiene efecto sobre las características del BS producido y juega un papel trascendental en la producción de su estructura (Onwosi et al., 2012).

Algunos autores han mencionado que el uso de sustratos inmiscibles como hidrocarburos, ácidos grasos o aceites pueden inducir la síntesis de biosurfactantes (Cameotra y Makkar 1998; Wu et al., 2008) ya que como son fuentes de difícil acceso los microorganismos segregan este metabolito para acceder a ellas. Sin embargo, en el presente trabajo este efecto no fue observado, ya que el empleo de aceite de soya no dio actividad en todos los casos. Resultados similares reportaron Batista et al., (2006), quienes aislaron 17 microorganismos productores de BS y la única fuente de carbono en la que todos produjeron este metabolito fue la glucosa.

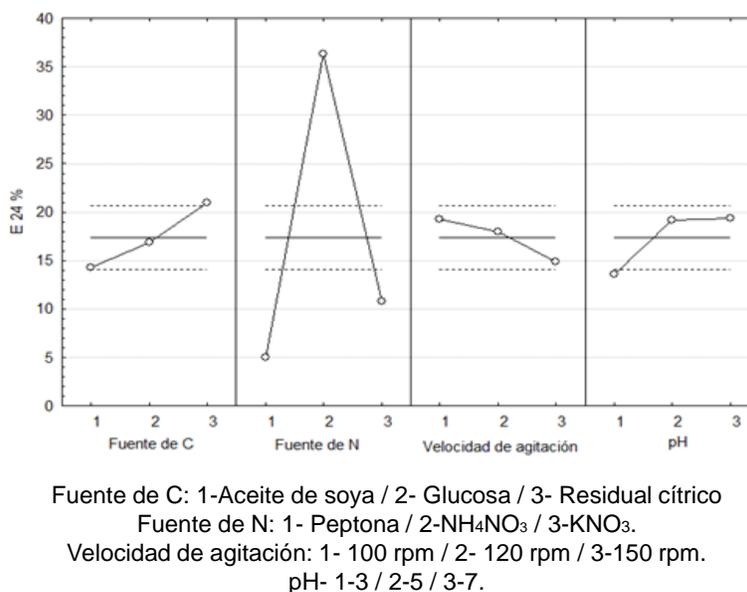
Onwosi et al., (2012) evaluaron diferentes fuentes de carbono, tanto miscibles como inmiscibles para la producción de BS con *Pseudomonas nitroreducens* apreciando que se producía hasta 10 veces más ramnolípido con glucosa que con aceite de maní.

Cardoso et al., (2010), probaron fuentes miscibles e inmiscibles en la producción de BS con *Yarrowia lipolytica*, encontrando que las fuentes inmiscibles no favorecían la producción de BS. Ellos atribuyen este comportamiento a la asociación del BS con la pared celular y que sólo una baja cantidad de tensoactivo producido se libera cuando se utiliza un sustrato hidrofóbico.

Finalmente, para el género *Penicillium* han sido utilizadas fuentes miscibles como dextrosa y glucosa (Luna-Velasco et al., 2007; Yuan et al., 2006) como inmiscibles: residuos de grasa y aceite de oliva (Gautman et al., 2014; Camargo de Morais et al., 2003) teniendo en ambas situaciones producción de BS, lo que indica que no hay una fuente de carbono específica para la producción de este metabolito, más bien la producción depende del metabolismo de cada microorganismo.

Se sabe que la velocidad de agitación está relacionada con la transferencia de masa, oxígeno y componentes del medio, por lo cual juega un papel importante en la producción de BS (Reis et al., 2010; Ricalovic et al., 2012).

En el caso del hongo AL-L44 la agitación no tuvo un efecto significativo sobre la actividad emulsificante (Fig. 8.11); sin embargo, para obtener un mayor diferencial de la tensión superficial se requieren agitaciones bajas. Este fenómeno puede ser atribuido a un estrés mecánico inducido a la célula por la elevada agitación (Cardoso et al., 2010).

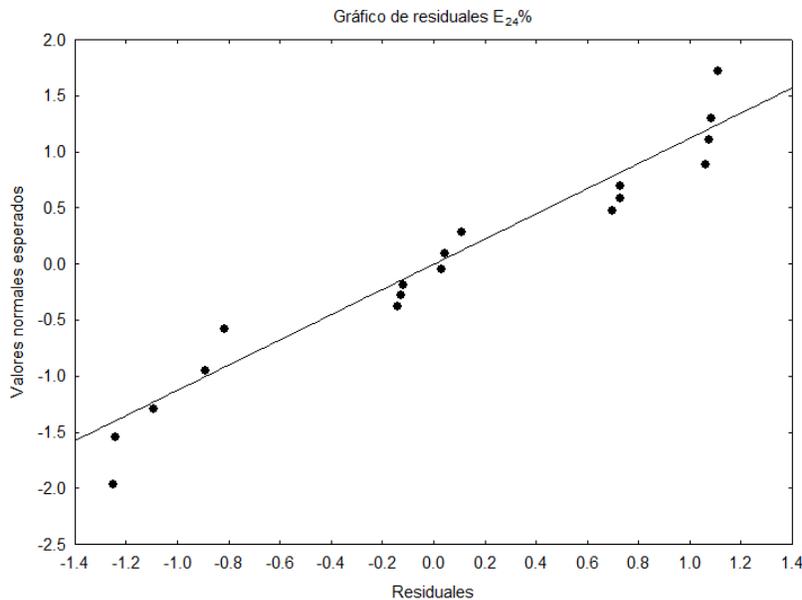


**Fig. 8.10** Efecto de las variables independientes sobre la actividad emulsificante.

**Tabla 8.2** Análisis de varianza del diseño de experimentos, utilizando la actividad emulsificante como variable de respuesta.

	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Fuente de C</b>	203.339	2	101.670	12.3100	0.000427
<b>Fuente de N</b>	5006.877	2	2503.438	303.1131	0.000000
<b>Velocidad de agitación</b>	92.168	2	46.084	5.5798	0.013014
<b>pH</b>	198.215	2	99.107	11.9998	0.000488
<b>Residual</b>	148.664	18	8.259		

El análisis de residuales realizado para la actividad emulsificante con un  $\alpha$  de 0.05 presentó un ajuste cercano a los valores esperados, lo que demuestra que el ajuste del modelo es confiable (Fig. 8.11) con un  $R^2$  de 0.84; sin embargo, el valor del coeficiente de variación fue alto (CV: 88.96 %), lo que indicó que menos del 20% de las variables responden a las variaciones del modelo.



**Fig. 8.11** Gráfico de residuales para la actividad emulsificante

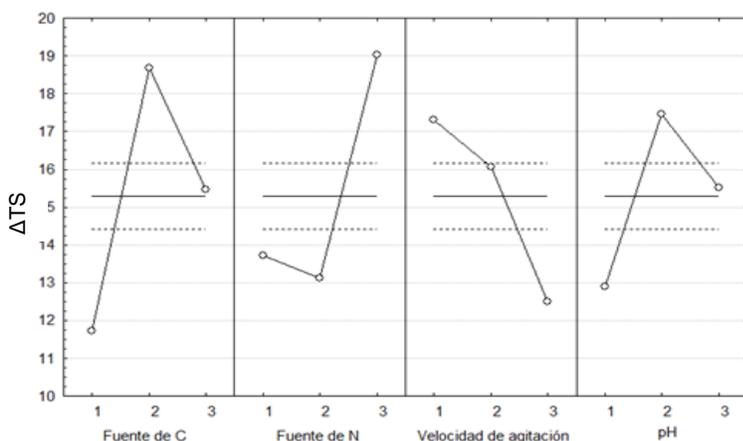
### 8.3.2 Efecto de las variables evaluadas sobre la diferencial de la tensión superficial

El análisis estadístico del diseño de experimentos para el máximo valor de  $\Delta TS$  (Fig. 8.12), demostró que todas las variables fueron significativas ( $p < 0.005$ ). Las condiciones del tratamiento 6 (Glucosa /  $KNO_3$  / 100 rpm / pH 5) fueron las óptimas para obtener la mejor actividad tensoactiva (Tabla 8.3). En este caso se tuvo una  $R^2$  de 0.73, con un valor de CV 31.99%; el coeficiente de variación fue menor que para la actividad emulsificante, lo que demuestra que para este caso las variables responden a las variaciones del modelo.

**Tabla 8.3** Análisis de varianza para la diferencial de la tensión superficial ( $\Delta TS$ )

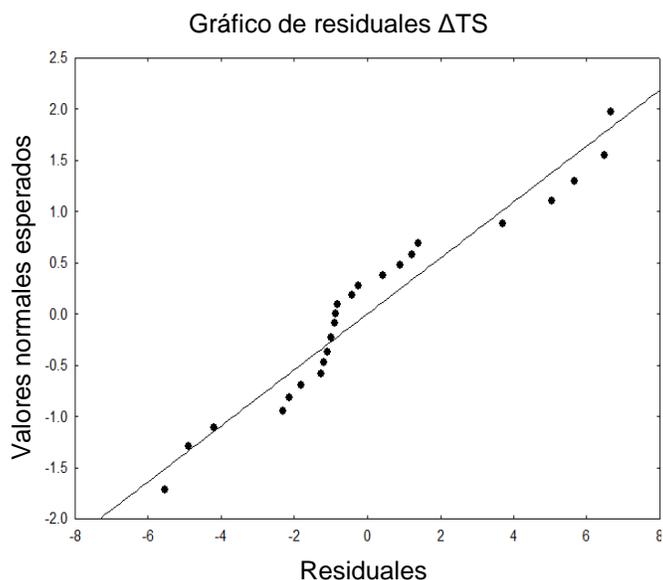
	SS	DF	MS	F	P
<b>Fuente de C</b>	218.5761	2	109.2881	190.0322	< 0.0001
<b>Fuente de N</b>	189.2428	2	94.6214	164.5295	< 0.0001
<b>Velocidad de agitación</b>	112.2305	2	56.1152	97.5742	< 0.0001
<b>pH</b>	94.8539	2	47.4270	82.4669	< 0.0001
<b>Residual</b>	10.3519	18	0.5751		

El análisis de residuales con un  $\alpha$  de 0.05 presentó un ajuste cercano a los valores esperados, lo que demuestra que el ajuste del modelo es confiable (Fig. 8.13).



Fuente de C: 1-Aceite de soya / 2- Glucosa / 3- Residual cítrico  
Fuente de N: 1- Peptona / 2-  $NH_4NO_3$  / 3-  $KNO_3$ .  
Velocidad de agitación: 1- 100 rpm / 2- 120 rpm / 3-150 rpm.  
pH- 1-3 / 2-5 / 3-7.

**Fig. 8.12** Efecto de las variables independientes sobre la  $\Delta TS$ .



**Fig. 8.13** Gráfico de residuales para el diferencial de tensión superficial

#### 8.4 Cinética de crecimiento y determinación de TS y $E_{24}$

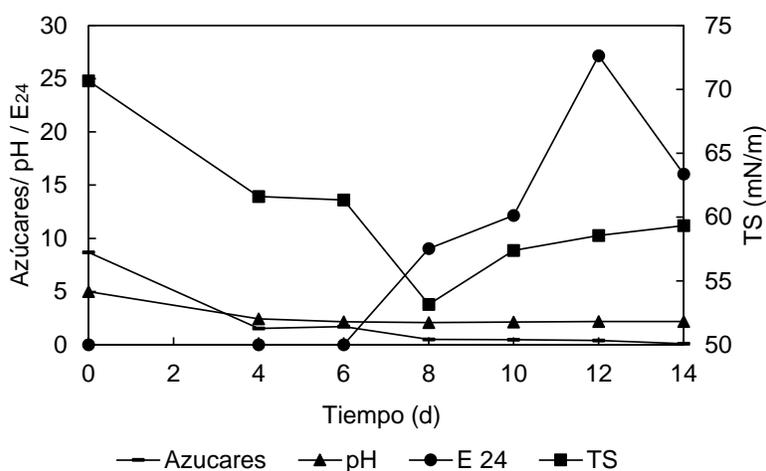
Una vez obtenidos los resultados del diseño de experimentos se optó por utilizar  $NH_4NO_3$  como fuente de nitrógeno buscando tener actividad emulsificante y glucosa como sustrato, 120 rpm y pH de 5, como lo indico el diseño para favorecer la actividad tensoactiva.

El microorganismo se desarrolló durante 14 días, encontrándose la mayor actividad tensoactiva al día 8 ( $\Delta TS: 17.5 \text{ mN/m}$ ) y la mayor actividad emulsificante al día 12 (27.14%) (Fig. 8.14).

Durante el desarrollo del microorganismo el pH se mantuvo en un valor constante de 2 desde el 4° día, este comportamiento se puede atribuir a la presencia de ácidos orgánicos (Serna-Posso, 2015).

Por otra parte, se apreció que al 8° día se había consumido 95% del sustrato, y en este tiempo fue donde se obtuvo la mayor actividad tensoactiva, este comportamiento está asociado con una limitante en la fuente de carbono lo que induce un estrés en la célula el cual ocasiona que segregue diferentes metabolitos para garantizar su existencia (Wadekar

et al., 2010), un ligero aumento en la TS después de este suceso es apreciado, que puede ser atribuido a que el microorganismo empieza a utilizar el bioproducto como fuente de nutrientes.



**Fig. 8.14** Evaluación de la producción de BS mediante TS y E<sub>24</sub> por *P. crustosum* AL-L44 , consumo de sustrato y pH, utilizando glucosa como fuente de carbono, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno, a 120 rpm y pH inicial de 5.

### 8.5 Purificación parcial del biosurfactante

Diferentes metodologías fueron utilizadas buscando purificar el BS producido por *P. crustosum*. La metodología 1 (purificación con acetona) y 2 (extracción con hexano y acetato de etilo) actuaron de manera desfavorable sobre la actividad emulsificante; sin embargo, con la metodología 3 (precipitación/extracción con cloroformo:etanol) se obtuvo un producto con una  $\Delta$ TS de 33 mN/m, logando una TS mínima de 37 mN/m y una E<sub>24</sub> de 71.43 % con diésel la cual se mantuvo hasta 48 h.

Los valores obtenidos son similares a los obtenidos por Monteiro et al., 2009 quienes obtuvieron una TS de 44.9 mN/m y una E<sub>24</sub> de 75.8%; para el género *Penicillium* se tienen reportes de altos valores de E<sub>24</sub> (hasta 80%) pero sin actividad tensoactiva (Camargo-de-Morais et al., 2003) o bajos valores de TS (60.13 mN/m) (Yuan et al., 2006), por lo que el producto obtenido es de gran interés.

## 8.6 Estabilidad del biosurfactante a diferentes condiciones

Al producto semipurificado se le evaluó su capacidad tensoactiva y emulsificante a diferentes condiciones de pH, temperatura y salinidad (Fig. 8.15). Observando que ambas propiedades son estables hasta los 80 °C por un periodo de 18 h (Fig. 8.15B).

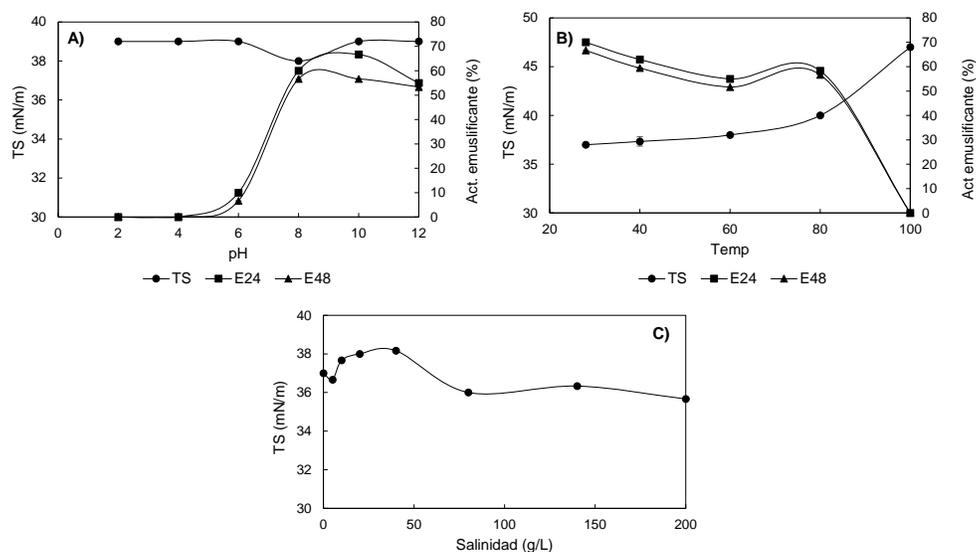
En cuanto al pH, se observó que este parámetro no afectó la actividad tensoactiva, pero si la emulsificante, siendo estable solamente en un intervalo de 8 a 12 (Fig.8.15A). Este comportamiento ha sido observado en surfactantes de naturaleza aniónica ya que a valores de pHs bajos su carga se vuelve neutra (Jean-Louis, 2002).

La salinidad fue el parámetro con mayor impacto negativo en la actividad emulsificante, apreciándose que a condiciones salinas el extracto no presenta actividad, sin embargo, la actividad tensoactiva no se vio afectada bajo dichas condiciones (Fig.8.15C).

Aparna et al., (2012) reportaron un comportamiento similar en el cual el BS producido por *Pseudomonas sp.* mantuvo una mayor estabilidad en la propiedad tensoactiva que en la actividad emulsificante.

Varadavenkatesan y Ramachandra, (2013) evaluaron la estabilidad del BS producido por *Bacillus sp.* y observaron también que la propiedad tensoactiva del producto era más estable que la emulsificante, teniendo valores semejantes a los obtenidos en este trabajo.

Existen pocos trabajos sobre la estabilidad de los bioproductos obtenidos por el género *Penicillium*. Contrario a esta investigación Luna et al., (2007) y Gautman et al., (2014) encontraron que los biosurfactantes producidos por *Penicillium sps.* y *P. chrysogenum* tenían estabilidad a pHs ácidos y altas salinidades, probablemente por la naturaleza obtenida de sus productos, ya que como se discutió anteriormente las condiciones nutricionales juegan un papel importante en la estructura del BS obtenido.



**Fig. 8.15** Estabilidad del BS producido por *P. crustosum* AL-L44 sometido a diferentes condiciones de A) pH, B) Temperaturas, C) Salinidad.

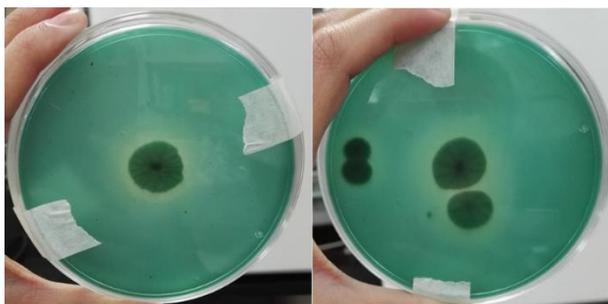
**Tabla 8.4** Estabilidad de BS producidos por diferentes microorganismos

Microorganismo	Temperatura (°C)	pH	Salinidad (% w/v)	Referencia
<i>Pseudomonas sp.</i>	Hasta 100 (30 min, TS y E <sub>24</sub> )	2 – 12 (TS) 8 – 12 (E <sub>24</sub> )	20 (TS) 8 (E <sub>24</sub> )	Aparna et al., 2012
<i>Bacillus sp.</i>	Hasta 120 (30 min, TS y E <sub>24</sub> )	2 – 12 (TS) 7 – 8 (E <sub>24</sub> )	20 (TS) 2.5 (E <sub>24</sub> )	Varadavenkatesan & Ramachandra, 2013
<i>Trichosporon asahii</i>	Hasta 100 (15 min, TS)	2 – 8 (TS)	8 (TS)	Preethy Chandran et al., 2010
<i>Trichosporon montevideense</i>	Hasta 100 (60 min, E <sub>24</sub> )	1 – 10 (E <sub>24</sub> )	-	Monteiro et al., 2009
<i>Penicillium sp.</i>	Hasta 93 (30 min, E <sub>24</sub> )	3 – 7 (E <sub>24</sub> )	20 (E <sub>24</sub> )	Luna et al., 2007
<i>P. chrysogenum</i>	-	3 – 7 (E <sub>24</sub> )	-	Gautman et al., 2014
<i>Penicillium crustosum</i> AL-L44	Hasta 80 (30 min, TS y E <sub>24</sub> )	2 – 12 (TS) 8 – 12 (E <sub>24</sub> )	20 (TS)	Este trabajo

TS: Tensión superficial / E<sub>24</sub>: Actividad emulsificante

## 8.7 Caracterización del biosurfactante

Con la finalidad de conocer la naturaleza del BS producido por *P. crustosum* AL-L44, el microorganismo fue cultivado en agar azul el cuál es un método semi cuantitativo para la detección de glicolípidos o la producción de surfactantes aniónicos (Čipinytė et al., 2011); mediante la formación de un halo alrededor de la colonia formada por el microorganismo. En la figura 8.16 se observa que el hongo *P. crustosum* AL-L44 formó un halo alrededor de la colonia, lo que significa que esta prueba fue positiva, indicando que el biosurfactante que produce el hongo es de tipo aniónico.



**Fig. 8.16** *Penicillium crustosum* AL-L44 cultivado en agar azul

Otros microorganismos productores de BS que han resultado positivos a la prueba del agar azul han sido *Pseudomonas* sp. (Aparna et al., 2012 a), *Pseudoxanthomonas* sp. (Nayak et al., 2009) y *Bacillus clausii* 5B (Aparna et al., 2012 b); los 2 primeros pertenecientes a un glicolípidos y el último a un lipopéptido como el caso de *P. crustosum* AL-L44.

La naturaleza aniónica del producto explica porque es estable en pHs básicos (sección 8.6) y esto puede ser un beneficio en el proceso de biorremediación ya que los surfactantes de este tipo compiten por los sitios activos en los suelos, logrando un desplazamiento de diversos xenobióticos, haciéndolos a su vez accesible para los microorganismos degradadores (Gaynor y Volk, 1976).

### 8.7.1 Composición del producto

De manera general los BS están formados por lípidos, proteínas y carbohidratos (Velázquez et al., 2011). El producto semi-purificado obtenido en este trabajo, también presentó estos 3 componentes en su composición (Tabla 8.5).

Composiciones similares se han obtenido en lipopéptidos segregados por *B. cereus* con glucosa como fuente de carbono y una fuente mixta de nitrógeno conformada por NH<sub>4</sub>Cl/ peptona (Velázquez et al., 2011); en *B. clausii* con glucosa como fuente de carbono y NH<sub>4</sub>Cl como fuente de nitrógeno (Aparna et al., 2012<sup>b</sup>). También en el género *Penicillium* con una fuente mixta de carbono compuesta por glucosa y peptona y una fuente mixta de nitrógeno compuesta por (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y peptona (Luna et al., 2007), se tuvo una composición similar.

Un aspecto importante de resaltar es que en los 3 casos mencionados de composición similar de los biosurfactantes, las fuentes de carbono y nitrógeno fueron semejantes (glucosa y amonio), con lo cual se podría suponer que existe una estrecha relación entre las fuentes de C y N con la estructura del BS producido.

Otros trabajos de producción de BS por el género *Penicillium* han reportado un mayor porcentaje de carbohidratos y menor contenido de proteínas lo que podría explicar las diferencias en las propiedades tensoactivas del producto (Camargo et al., 2013).

Existen otros trabajos sobre producción de BS con otros microorganismos donde se han encontrado que están compuestos solamente de carbohidratos y lípidos (Anyanwu et al., 2010; Aparna et al., 2012), o carbohidratos y proteínas (Liu et al., 2010).

**Tabla 8.5** Composición de BS producidos por diferentes microorganismos

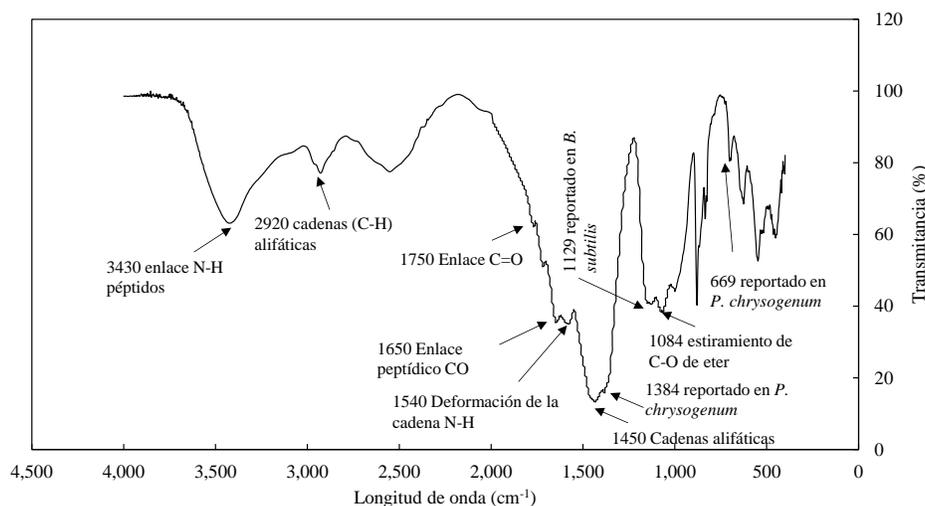
<b>Microorganismo</b>	<b>Carbohidratos (%)</b>	<b>Lípidos (%)</b>	<b>Proteínas (%)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Serratia marcescens</i>	46.3	50.2	-	Anyanwu et al., 2010
<i>Pseudomonas sp.</i>	32	65	-	Aparna et al., 2012 a
<i>Bacillus cereus</i>	2.6	44.4	53	Velázquez et al., 2011
<i>B. subtilis</i>	8.6 - 9.2	-	45.3 - 45.9	Liu et al., 2010
<i>B. clausii</i> 5B	-	56	32	Aparna et al., 2012 b
<i>Trichosporon asahii</i>	31.85	68.2	-	Chandran et al., 2010
<i>Penicillium citrinum</i>	43	51	6	Camargo et al., 2003
<i>Penicillium sp.</i>	11	67	7	Luna et al., 2007
<i>Penicillium crustosum</i> AL-L44	3.13	76	20.87	Este trabajo

### 8.7.2 Análisis infrarrojo

El análisis infrarrojo realizado al biosurfactante del hongo *P. crustosum* AL-L44 como producto seco, demostró picos característicos de los BS (Fig. 8.17). Evidenciando la presencia de componentes peptídicos con bandas de absorción a los 3430  $\text{cm}^{-1}$  pico representativo del estrechamiento del enlace N-H; a los 1650  $\text{cm}^{-1}$  resultante del estrechamiento del enlace CO-N, con un pico confirmativo a los 1540  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la deformación del enlace N-H combinado con el estrechamiento del enlace C-N (Fonseca et al., 2011).

También fue posible evidenciar la presencia de cadenas alifáticas reportadas desde los 3000 hasta los 2800  $\text{cm}^{-1}$  y desde los 1450 a los 1380  $\text{cm}^{-1}$  (El-Sheshtawy et al., 2015).

Por otra parte, también se encontraron bandas a los 657 y 1129  $\text{cm}^{-1}$  que han sido reportadas en el BS producido por *B. subtilis* (El-Sheshtawy et al., 2015), sin embargo, no se tiene una idea clara de lo que representan estas bandas.



**Fig. 8.17** Espectro de infrarrojo del BS producido por *Penicillium crustosum* AL-L44.

### 8.8 Evaluación de la actividad emulsificante con diferentes aceites

Dado que se tiene poca información del BS producido por *Penicillium crustosum* se optó por evaluar su actividad emulsificante en presencia de diferentes aceites y/o hidrocarburos, apreciándose que este tiende a emulsificar más en hidrocarburos destilados del petróleo como un aceite de motor gastado con el que tuvo hasta un 47.78 % de actividad comparado

con un aceite vegetal como aceite de soya con el cual solamente dio 6.67 % (Tabla 8.6). Lo anterior indica que el BS producido tiene mayor especificidad por los hidrocarburos del petróleo, implicando una interacción directa con el propio hidrocarburo en lugar de un efecto sobre la tensión superficial del medio (Rufino et al., 2007) abriendo otra aplicación para dicho bioproducto.

Un caso similar se apreció con el grupo de trabajo de Markande et al., 2013 quienes probaron el BS producido por *Solibacillus silvestris* en diferentes aceites encontrando que emulsificaba más con hidrocarburos que con aceites vegetales.

Lo mismo se encontró con *Candida lipolytica* (Rufino et al., 2007) la cual emulsificó hasta un 100 % con aceite de motor y menos de un 20 % con aceite de maíz.

También Fonseca et al., (2011) encontraron que la surfactina segregada por *B. subtilis*, otorga actividades emulsificantes con este tipo de hidrocarburos otorgando hasta 59 % con queroseno y 55 % con diésel.

**Tabla 8.6** Actividades emulsificantes ante diferentes aceites

<b>Aceite</b>	<b>E<sub>24</sub> (%)</b>
Diesel	71.43 ± 2.35
Aceite de motor gastado	47.78 ± 1.57
Xileno	6.67 ± 0
Hexano	0
Aceite de soya	6.67 ± 0

E<sub>24</sub>: Actividad emulsificante

### 8.9 Actividad antimicrobiana del BS

Otra de las propiedades conocidas de los BS es su actividad antimicrobiana; por ello se evaluó la capacidad de inhibición de crecimiento de 2 microorganismos patógenos Gram negativos (*Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*), los cuales presentaron inhibición en su crecimiento con una relación 1:1 (Agar nutritivo: BS).

### 8.9.1 Caracterización de las cepas a utilizar

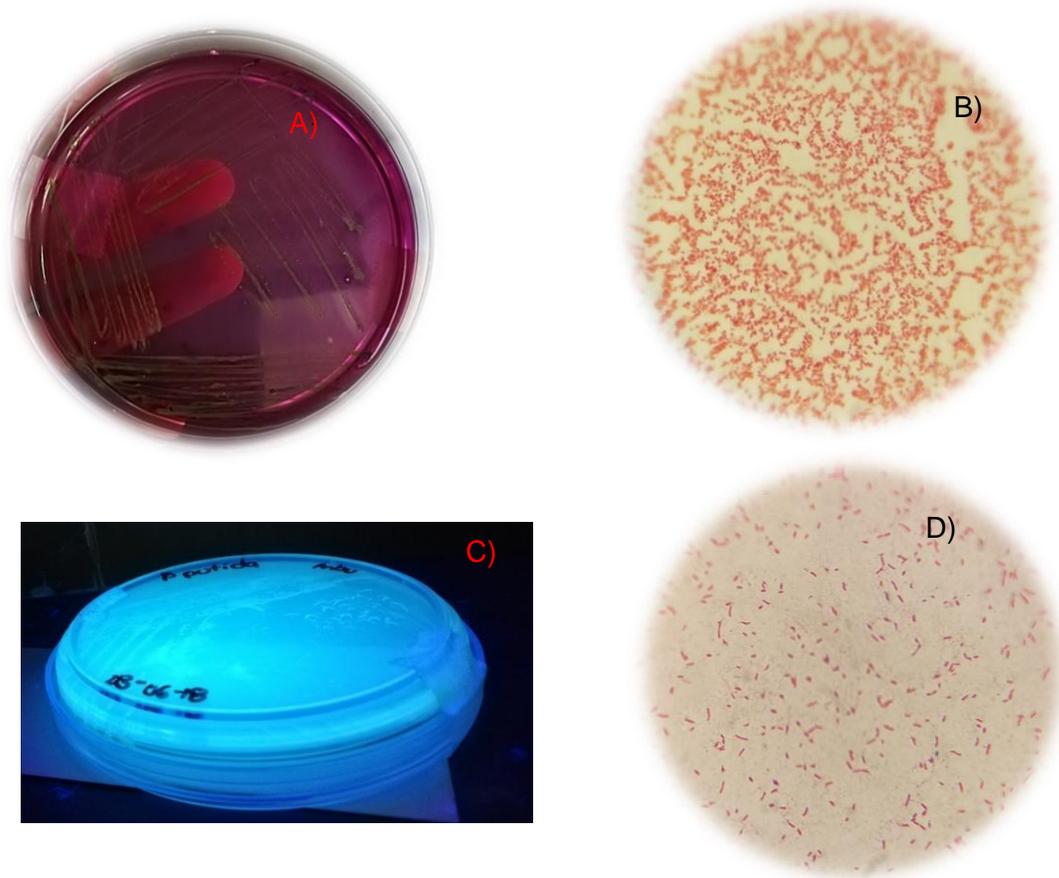
*Escherichia coli* es un bacilo corto, Gram negativo, capaz de desarrollarse en agar E.M.B presentando colonias verdes metálicas. Su temperatura óptima de incubación fue 37 °C (Fig. 8.18 a y b).

*Pseudomonas putida* es un bacilo, Gram negativo, capaz de desarrollarse en agar cetrimida presentando fluorescencia al ser expuesto a luz UV. Su temperatura óptima de incubación fue 37 °C (Fig 8.18 c y d).

Ambos microorganismos fueron cultivados en agar nutritivo con la finalidad de identificarlos macroscópicamente (Tabla 8.7)

**Tabla 8.7** Caracterización macroscópica de *E. coli* y *P. putida*

<b>Morfología</b>	<b><i>E coli</i></b>	<b><i>P. Putida</i></b>
Forma	Circular	Circular
Elevación	Plana	Elevada
Borde	Entero	Entero
Color	Crema	Crema
Superficie	Rugosa	Lisa
Aspecto	Húmedo	Húmedo
Consistencia	Suave	Suave
Luz reflejada	Opaca	Brillante



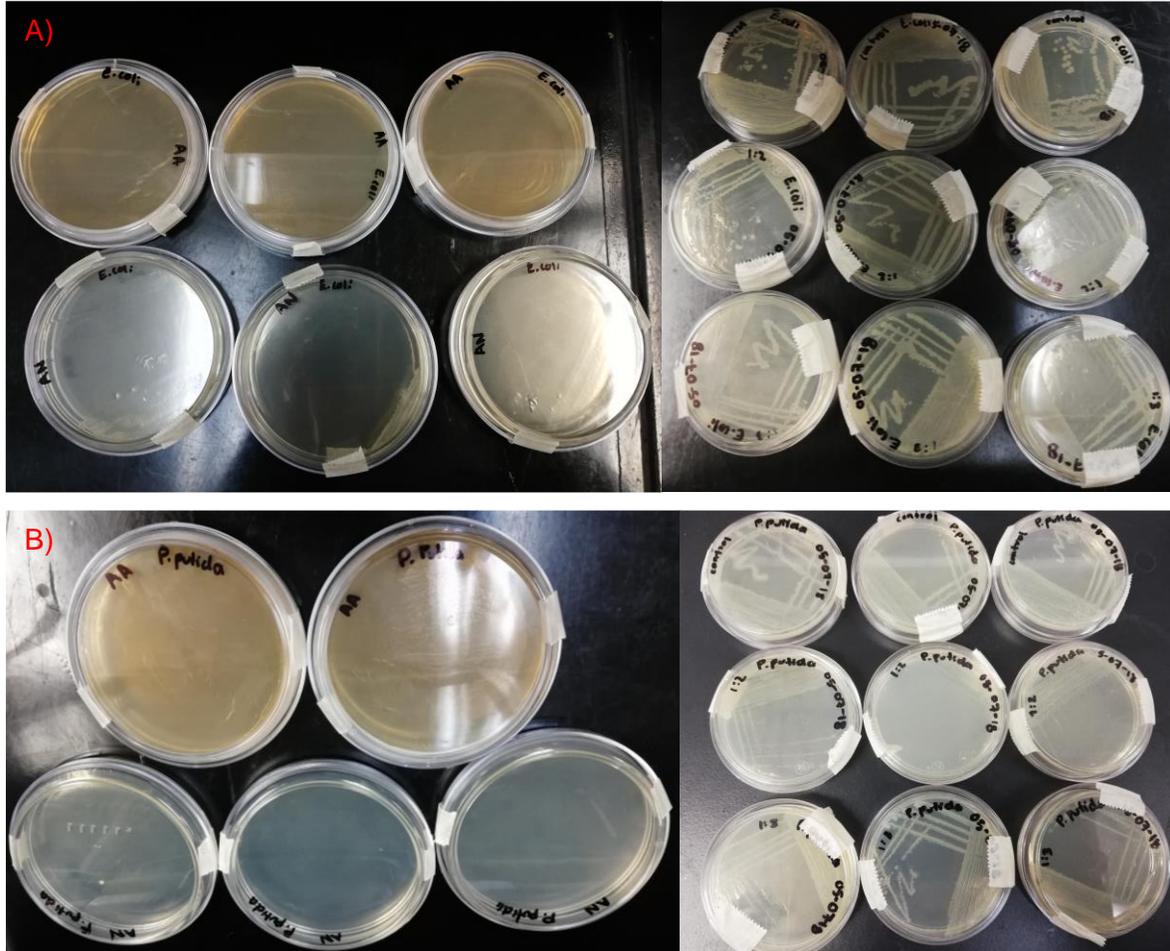
**Fig. 8.18** Caracterización macroscópica de los microorganismos utilizados a) *E. coli* en agar EMB, b) Observación microscópica con tinción de Gram a 100X para *E. coli*; c) *P. putida* en agar cetrimida expuesta a luz UV; d) Observación microscópica con tinción de Gram a 100X para *P. putida*

### 8.9.2 Inhibición bacteriana

Ambos microorganismos presentaron una inhibición en su crecimiento tanto en agar con BS como fuente de carbono, así como en una relación agar nutritivo:BS (1:1).

Relaciones 1:2 y 1:3 también fueron evaluadas, sin embargo, a estas relaciones ambos microorganismos presentaron crecimiento (Fig. 8.19 a y b).

Para probar el efecto del BS *In situ* solamente se evaluó el cultivo de *E. coli* por la facilidad del conteo de colonias en agar EMB; ya que otros microorganismos pueden crecer en agar cetrimida otorgando resultados falsos positivos.



**Fig. 8.19** Inhibición en el desarrollo de a) *E. coli* y b) *P. putida*

Comparando estos resultados con otros trabajos se aprecia que glicolípidos y lipopéptidos producidos por diferentes microorganismos, entre los que destacan los géneros *Candida*, *Pseudomonas* y *Bacillus* tienen una conducta similar en la inhibición del crecimiento de *E. coli* (Tabla 8.8).

Una de las posibles explicaciones a esta actividad está dada por el mecanismo de acumulación de BS en la pared celular, lo que implica un desequilibrio electrolítico por el ingreso de una mayor cantidad de iones  $\text{Ca}^{+2}$ ;  $\text{H}^+$  a la célula; otra posible explicación consiste en el intercalado en la bicapa de fosfolípidos en la membrana, alterando la

formación de proteínas, el transporte y generación de energía lo que conduce a la muerte celular. (Ndlovu et al., 2017)

También se sabe que los surfactantes de naturaleza aniónica pueden interactuar con las macromoléculas como péptidos y enzimas alterando la función biológica de los microorganismos (Mao et al., 2015)

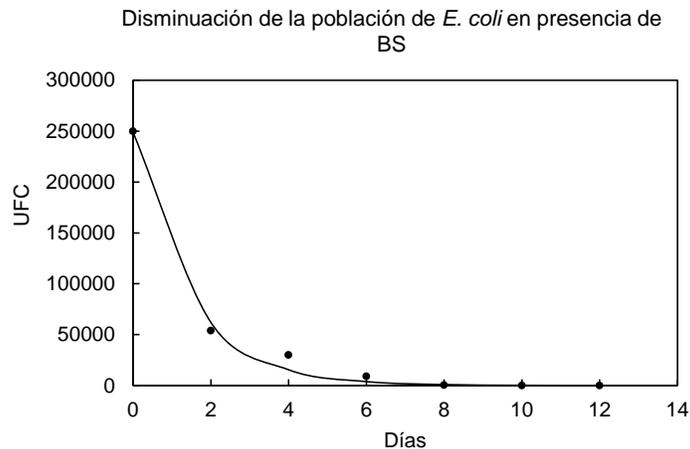
**Tabla 8.8** Microorganismos productores de BS con actividad antimicrobiana

<b>Microorganismo</b>	<b>Inhibe el crecimiento de</b>	<b>Referencia</b>
<i>B. subtilis</i> SPB1	<i>Staphylococcus aureus</i> , / <i>S. xylosus</i> / <i>Enterococcus faecalis</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Escherichia coli</i>	Ghribi et al., 2012
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>E. coli</i> / <i>Salmonella typhimurium</i> / <i>Enterococcus faecalis</i>	Ndlovu et al., 2017
<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i> / <i>S. typhimurium</i> / <i>E. faecalis</i> / <i>Bacillus cereus</i>	Ndlovu et al., 2017
<i>C. sphaerica</i>	<i>Streptococcus oralis</i> (68%) / <i>Candida albicans</i> (57%) / <i>Staphylococcus epidermidis</i> (57.6%)	Luna et al., 2011
<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kitamoto et al., 2002
<i>P. crustosum</i> AL-L44	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	Este trabajo

### 8.9.2.1 Aplicación del BS a un suelo contaminado con *E.coli*

A 10 g de un suelo contaminado con *E. coli* proveniente de la zona chinampera, se le añadieron 10 mL de BS semipurificado en sistemas de microcosmos los cuales fueron aireados diariamente; apreciándose que a partir del 2° día había disminuido un 78.4 % la población (Fig. 8.20) y para el 8° día un 99.79 %, lo que muestra que el BS también puede ser utilizado en la zona chinampera para la remoción de patógenos.

*E. coli* es una bacteria cotidianamente encontrada en el intestino de muchos seres vivos de manera inocua; sin embargo, al producir la toxina conocida como shiga llega a causar diversas enfermedades gastrointestinales (OMS, 2018). Una de las posibles formas en las que cotidianamente se encuentra esta toxina proviene de las hortalizas contaminadas con materia fecal la cual tradicionalmente es utilizada como abono agrícola.



**Fig. 8.20** Evaluación de la inhibición del crecimiento de *E. coli* en suelo en presencia de BS.

Estos resultados resaltan otra aplicación importante del bioproducto producido por *P. crustosum* AL-L44.

## FASE II

### 8.10 Caracterización fisicoquímica del suelo a utilizar

El suelo modelo provino de una chinampa que actualmente es orgánica, la cual se encuentra localizada N 19° 16' 24.9", W 99° 05' 29.9" en la zona de Cuernavaca, el cual fue caracterizado fisicoquímicamente de acuerdo con la norma NMX-021 obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 8.9.

**Tabla 8.9** Caracterización fisicoquímica del suelo modelo

<b>Propiedad</b>	<b>Contenido</b>	<b>Clasificación de acuerdo NMX-021</b>
pH	7.35 ± 0.76	Neutro
Conductividad (dS/m)	27.16 ± 2.41	Muy salino
Humedad (%)	90.67 ± 5.43	N/A
Carbono orgánico (%)	12.51 ± 0.15	N/A
Materia orgánica (%)	21.57 ± 0.25	Muy alto
Nitrógeno total (%)	0.8015 ± 0.06	Muy alto
Fósforo (mg/kg)	10.72 ± 0.53	Medio
Relación C/N	15.61	N/A
Arena (%)	33.04 ± 2.28	N/A
Arcilla (%)	36.24 ± 0.28	N/A
Limo (%)	30.72 ± 2.00	N/A
Clasificación del suelo	Franco – Arcilloso	N/A

N/A: No aplica

Los resultados obtenidos demuestran que el suelo a tratar presenta una alta salinidad, lo cual es un problema ampliamente conocido en Xochimilco, tanto que para 2006 se había reducido hasta un 85 % la superficie productiva de la zona chinampera (Guevara-Olivar et al., 2015); por lo cual es importante que el BS no pierda sus propiedades en condiciones salinas y que durante el proceso de biorremediación también se reduzca la conductividad; por otro lado pese a que la conductividad es alta el pH es neutro por lo cual se puede suponer que esta viene dada por iones metálicos.

La salinidad causa estrés fisiológico a los cultivos, el cual se ve reflejado en una reducción de la adsorción de nutrientes por las raíces, lo que afecta su capacidad agrícola (Botella-Marrero, 2017).

Comparando los datos obtenidos con los valores determinados por la NMX-021 se aprecia que el contenido de materia orgánica y nitrógeno es alto, esto puede ser atribuido a la adición previa de fertilizantes, por lo que es recomendable reducir la salinidad del suelo para hacerlo más fértil; sin embargo, la relación C/N es menor a 20 lo que indica una ligera

deficiencia de nitrógeno, por lo que sería recomendable adicionar una fuente de nitrógeno para favorecer las condiciones agrícolas (Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 2017).

Las características fisicoquímicas del suelo son semejantes a los previos valores reportados para este suelo, donde se encontró que era un suelo óptimo para las actividades agrícolas (Mora-Chablé, 2016).

Por otro lado, se sabe que los suelos agrícolas con fracciones superiores al 25% de limo y arcilla retienen suficiente agua, por lo que su permeabilidad se ve reducida y además se favorece la acumulación de compuestos xenobióticos (Leal et al., 2014).

### **8.11 Isotermas de adsorción del endosulfán en el suelo**

La capacidad de adsorción de plaguicida en el suelo fue evaluada impregnándolo con diferentes concentraciones de endosulfán, apreciando que la adsorción sigue un modelo de Freundlich con un valor de  $n$  cercano a 1 por lo que se puede considerarse que el modelo sigue la ley de Henry, lo cual es un comportamiento normal para describir la adsorción de plaguicidas en suelos (Fushiwaki & Urano, 2001). Que un suelo siga una isoterma de Henry quiere decir que la adsorción es directamente proporcional a la concentración de soluto.

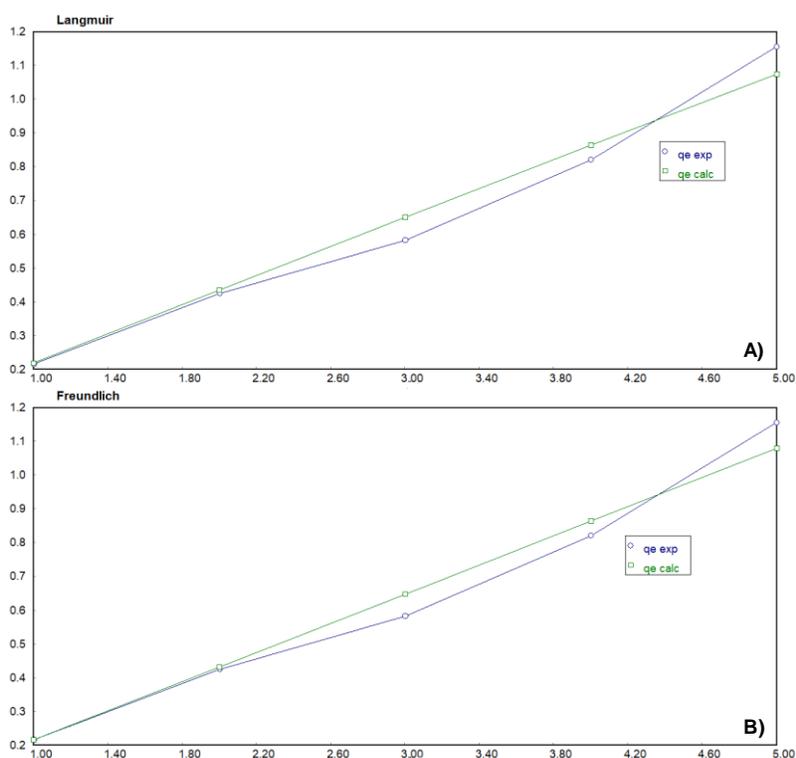
Ambos modelos indican que el suelo modelo es capaz de adsorber una mayor cantidad de endosulfán; sin embargo, la máxima concentración reportada de este plaguicida en nuestro país ha sido 0.9 mg/Kg (Wong et al., 2010) por lo que se decidió que el máximo valor evaluado en las isotermas fuera de 1 mg/Kg.

Tanto el modelo de Freundlich como el de Langmuir fueron ajustados con Polymath versión 6.0 (Figs. 8.21 a y b), en ambos casos las regresiones dieron una  $R^2$  de 0.98 y 0.97 respectivamente; las constantes cinéticas de los modelos se muestran en la Tabla 8.10.

Los valores determinados para estas constantes indican que la adsorción del plaguicida en el suelo es mediante una monocapa, puesto que el valor de  $n_f$  es cercano a 1. Este comportamiento también ha sido reportado en la adsorción de otros plaguicidas organoclorados como: pentacloronitrobenceno, pentacloroanilina, pentaclorotioanisol, pentaclorobenceno y clorotalonil (Fushiwak, & Urano, 2001)

**Tabla 8.10** Parámetros cinéticos de las isotermas de adsorción de endosulfán en el suelo

Modelo	Parámetro
Freundlich	$K_f$ : 1.04
	$n_f$ : 0.96
	$R^2$ : 0.977
Langmuir	$q_m$ : 48.58
	$K_L$ : 0.022
	$R^2$ : 0.975



**Fig. 8.21** Isotermas de adsorción de A) Langmuir, B) Freundlich

### 8.12 Fitotoxicidad del endosulfán en cultivos

Cuatro cultivos modelos fueron seleccionados para evaluar el efecto de la adición de 1 mg/kg de endosulfán podía tener sobre estos, así como ver la forma en la que se transloca o metaboliza el mismo; los cultivos seleccionados fueron: frijol bayo (*Phaseolus*

*leptostachyus*), chícharo (*Pisum sativum*), coliflor (*Brassica oleracea var. Botrytis*) y lechuga italiana (*Latuca sativa*).

### 8.12.1 Fitotoxicidad en el cultivo de frijol

El frijol fue el cultivo que creció más rápido, y se cultivó por un mes; se realizó el análisis estadístico con el programa SAS 9.1 para windows y se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la raíz, entre el cultivo control y el cultivo adicionado con endosulfán (Tabla 8.11), encontrándose que la raíz control era más larga y con mayor peso que la del cultivo expuesto a endosulfán; la parte aérea y el índice de germinación no presentaron diferencias significativas, lo que significa que el desarrollo del cultivo no se afecta con la adición del plaguicida.

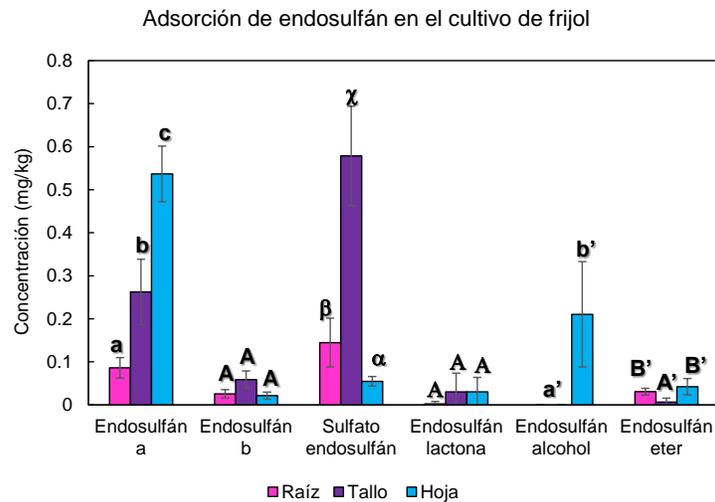
Un caso similar se presentó en el grupo de trabajo de Lannacone et al., (2000), quienes adicionaron lindano a diferentes cultivos y apreciaron un efecto negativo, únicamente en la raíz. También el grupo de Pereira et al., 2010 evaluaron la adición de hexaclorociclohexano en 9 cultivos diferentes, determinando un efecto en el tamaño y el peso de la raíz, pero no en el tamaño o el transporte de nutrientes; sin embargo, apreciaron la traslocación o metabolización del plaguicida.

**Tabla 8.11** Fitotoxicidad en planta de frijol

Parámetro	Control	Cultivo con endosulfán
Índice de germinación	93.75 ± 10.83 % <sup>a</sup>	90 ± 10 % <sup>a</sup>
Tamaño de raíz	9.036 ± 1.76 <sup>b</sup>	7.188 ± 0.95 <sup>a</sup>
Peso de raíz	0.662 ± 0.25 <sup>b</sup>	0.207 ± 0.09 <sup>a</sup>
Tamaño de parte aérea	20.215 ± 3.52 <sup>a</sup>	21.358 ± 2.99 <sup>a</sup>
Peso de parte aérea	1.437 ± 0.44 <sup>a</sup>	1.527 ± 0.47 <sup>a</sup>

- Letras diferentes indican diferencia estadística significativa con comparación de medias de Tukey.

También fue posible apreciar que el cultivo de manera natural metaboliza el plaguicida pues en la cuantificación de plaguicida residual en la raíz, tallo y fruto se encontraron la presencia de metabolitos secundarios (Fig. 8.22).



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa. Análisis estadístico realizado por metabolito.

**Fig. 8.22** Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en el cultivo de frijol.

Cabe mencionar que los metabolitos identificados se encuentran reportados en la ruta oxidativa como a la hidroxidativa, por lo que se supone que los microorganismos presentes en el suelo y en la planta realizan la degradación por diferente ruta; un caso similar lo presentó el grupo de trabajo de Tao et al., 2005, quienes tomaron muestras de diferentes suelos contaminados y cultivos, apreciando que los microorganismos presentes en el suelo juegan un papel importante en la degradación de los plaguicidas organoclorados.

La mayor cantidad de plaguicida sin metabolizar fue determinada en la hoja, esto puede tener 2 posibles explicaciones: una puede ser que en esta parte se tenga la mayor porción lipídica, aunque usualmente sucede en la raíz, por lo que, lo más factible sea mecanismo de defensa del vegetal buscando metabolizar el compuesto (Miglioranza et al. 1999).

También cabe mencionar que la mayor concentración de sulfato endosulfán se encontró en el tallo; el cual se podría suponer está actuando como una barrera para impedir que el compuesto pase a las hojas y se esperaría al fruto.

### 8.12.2 Fitotoxicidad en el cultivo de chícharo

Por su parte el cultivo del chícharo mostró ser más sensible a la adición del plaguicida, encontrando diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre el peso y tamaño de la raíz, así como el tamaño de la parte aérea (Tabla 8.12).

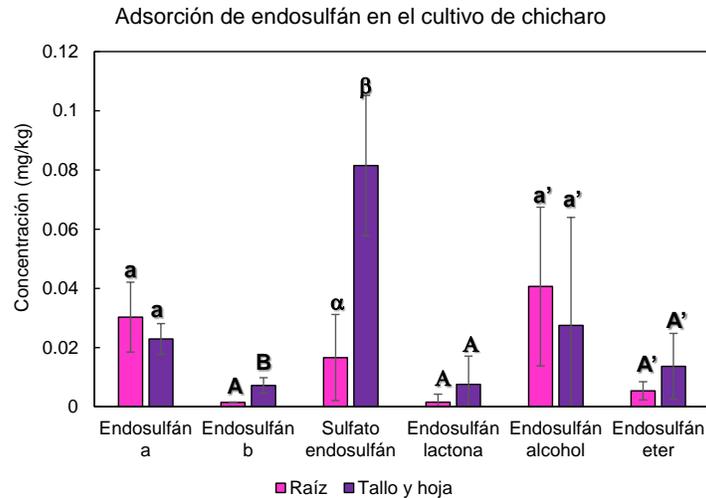
Sin embargo, la cantidad de plaguicida adsorbida fue mínima ( $< 0.1$  ppm) lo cual implica que la mayor cantidad de plaguicida permaneció en el suelo (Fig. 8.23); dado que se apreció un efecto considerable en la raíz se podría suponer que esta parte está actuando como una barrera para que el xenobiótico no traslade al vegetal.

Dado que se contaba con poca cantidad de material; ya que el contenido de humedad de este vegetal fue muy alto, la hoja y el tallo se tuvo que considerar en un solo grupo, por lo que no podríamos saber si al igual que en el caso del frijol el tallo está actuando como una barrera para impedir el paso de sulfato endosulfán; lo que si es posible apreciar es que la concentración de este compuesto es mayor en este grupo que en la raíz lo que sustenta la hipótesis de que en este cultivo la raíz está actuando como una barrera.

**Tabla 8.12** Fitotoxicidad en la planta de chícharo

Parámetro	Control	Cultivo con endosulfán
Índice de germinación	85.0 ± 12.25 % <sup>a</sup>	75 ± 15.81 % <sup>a</sup>
Tamaño de raíz	5.818 ± 0.78 <sup>b</sup>	5.038 ± 0.6 <sup>a</sup>
Peso de raíz	0.279 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.086 ± 0.042 <sup>a</sup>
Tamaño de parte aérea	19.01 ± 2.36 <sup>b</sup>	10.115 ± 0.74 <sup>a</sup>
Peso de parte aérea	1.106 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.058 ± 0.29 <sup>a</sup>

- Letras diferentes indican diferencia estadística significativa con comparación de medias de Tukey.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa. Análisis estadístico realizado por metabolito.

**Fig. 8.23** Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en el cultivo de chícharo.

Una posible explicación por la cual un cultivo adsorba el plaguicida, puede atribuirse al contenido lipídico del mismo; puesto que mientras el chícharo tiene entre 2 – 3 % de lípidos el frijol está compuesto entre 32 y 45 % de lípidos (Vicente-Murillo, 2011); sin embargo González et al., (2005) evaluaron el efecto que tenía el uso de 3 semillas diferentes de lechuga en un suelo contaminado con plaguicidas organoclorados, observando que pese a que se tenía la misma cantidad lipídica en el tallo y en la raíz en todas las semillas, la traslocación de los plaguicidas fue diferente, concluyendo que esta se encuentra más relacionada con potencial de adsorción de compuestos altamente hidrofóbicos por el tallo que por el contenido lipídico.

### 8.12.3 Fitotoxicidad en el cultivo de coliflor

Otro cultivo estudiado y cultivado en la zona chinampera fue la coliflor, el cual presentó diferencia estadística significativa en el índice de germinación, peso de la raíz y tamaño de la parte aérea (Tabla 8.13).

Estudios de fitotoxicidad realizados con hidrocarburos han demostrado un comportamiento similar (Arias-Trinidad et al., 2017), explicando que el efecto se debe a la penetración del xenobiótico a nivel celular, induciendo cambios metabólicos intracelulares y por el efecto hidrofóbico que restringe el contenido de agua y oxígeno.

Un estudio realizado por el grupo de trabajo de Calvelo-Pereira et al. (2010) a diferentes cultivos de vegetales en presencia de lindano, demostró que el estrés que sufrían los cultivos en la adición de plaguicidas estaba relacionado con el desequilibrio de los procesos bioquímicos de las semillas los cuales manifestaban la actividad enzimática hidrolítica. Esta hipótesis fue retomada del trabajo de Bidlan et al. (2004) donde se vio que la actividad enzimática, tanto de la proteasa como de la amilasa se inhibía en diferentes cultivos con presencia de 100 µg de Lindano.

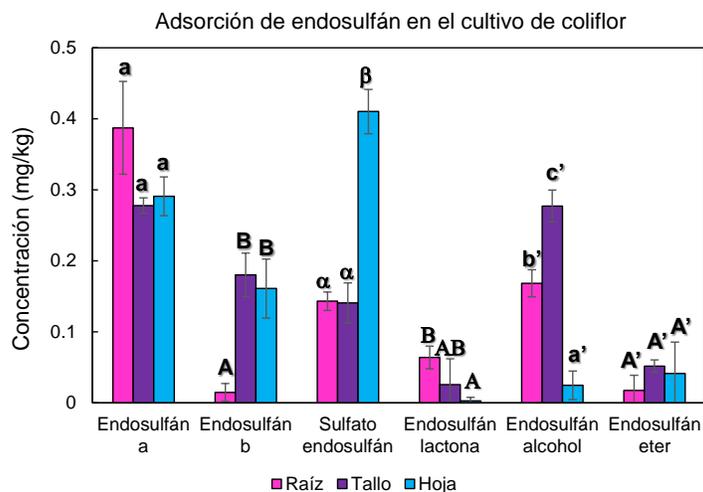
**Tabla 8. 13** Pruebas de fitotoxicidad en la planta de coliflor

<b>Parámetro</b>	<b>Control</b>	<b>Cultivo con endosulfán</b>
Índice de germinación	70 ± 14.49 % <sup>b</sup>	40 ± 20 % <sup>a</sup>
Tamaño de raíz	5.6 ± 0.42 <sup>a</sup>	5.18 ± 0.78 <sup>a</sup>
Peso de raíz	0.48 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.28 ± 0.07 <sup>a</sup>
Tamaño de parte aérea	13.14 ± 0.99 <sup>b</sup>	12.07 ± 0.49 <sup>a</sup>
Peso de parte aérea	1.57 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.17 <sup>a</sup>

- Letras diferentes indican diferencia estadística significativa con comparación de medias de Tukey.

Al igual que en el cultivo de chícharo se encontró la mayor cantidad de plaguicida sin metabolizar en la raíz (Fig. 8.24), sin embargo, en este caso si se aprecia traslocación del xenobiótico a la parte aérea por lo cual aquí la raíz no está actuando como una barrera sin embargo está teniendo efecto toxicológico apreciándose un menor peso.

Al igual que en el caso de la planta de frijol se apreciaron metabolitos del endosulfán tanto en el tallo como en la hoja por lo que se puede suponer que el vegetal está metabolizando el xenobiótico y buscando volatilizar lo más tóxico pues la mayor concentración de sulfato endosulfán fue encontrado en las hojas; sin embargo es de preocuparse que exista altas concentraciones en las hojas ya que es probable que el producto final tenga altas concentraciones de este metabolito; por ello la importancia de biorremediar el suelo antes de cultivar en él.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa. Análisis estadístico realizado por metabolito.

**Fig. 8.24** Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en cultivo de coliflor

#### 8.12.4 Fitotoxicidad en el cultivo de lechuga italiana

La lechuga italiana es un cultivo desarrollado en la zona de Cuernavaca; sin embargo, se apreció que en este vegetal se translocaba una cantidad mínima de xenobiótico < 0.2 ppm para la raíz y < 0.03 para la parte aérea (Fig. 8.25).

Las pruebas fitotoxicológicas (Tabla 8.14) demostraron únicamente diferencia estadística significativa en el índice de germinación entre el control y el cultivo germinado en un suelo contaminado con endosulfán.

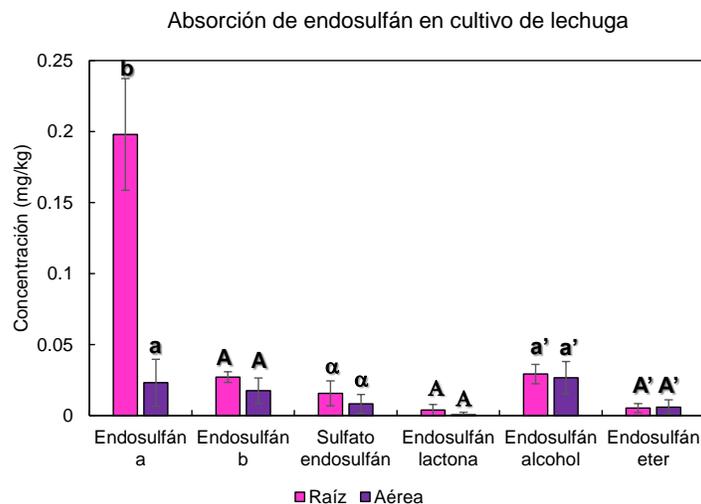
En estudios realizados por otros autores con hidrocarburos se menciona que la variable toxicológica más sensible y por lo tanto más estudiada es el índice de germinación, ya que en esta etapa el desarrollo de la semilla se encuentra más vulnerable a las condiciones medioambientales (Calvelo Pereira et al., 2010); indicando que valores  $\geq 80\%$  indican que no hay sustancias fitotóxicas, valores entre 50 y 80% corresponden a sustancias moderadamente tóxicas e I.G.  $\leq 50\%$  indican sustancias altamente tóxicas (Varnero et al., 2007); por lo que siguiendo este argumento el endosulfán podría ser clasificado como una sustancia moderadamente tóxica para el desarrollo del cultivo de lechuga; sin embargo su desarrollo no se vio comprometido como ocurrió con otros vegetales, probablemente por la concentración tan baja que translocó al vegetal.

**Tabla 8.14** Pruebas de fitotoxicidad en la planta de lechuga italiana

Parámetro	Control	Cultivo con endosulfán
Índice de germinación	91.67 ± 14.43 % <sup>b</sup>	58.33 ± 16.67 % <sup>a</sup>
Tamaño de raíz	3.09 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.86 ± 0.58 <sup>a</sup>
Peso de raíz	0.22 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.04 <sup>a</sup>
Tamaño de parte aérea	5.29 ± 0.52 <sup>a</sup>	5 ± 0.82 <sup>a</sup>
Peso de parte aérea	0.64 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.14 <sup>a</sup>

- Letras diferentes indican diferencia estadística significativa con comparación de medias de Tukey.

Una posible explicación por la cual el plaguicida no ingreso al cultivo es por su alto contenido acuoso, pues este compuesto tiende a acumularse en las porciones lipídicas y es poco soluble en agua, a lo que probablemente no haya ingresado al cultivo o se haya volatilizado directamente (Arellano-Aguilar, 2016).



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa. Análisis estadístico realizado por metabolito.

**Fig. 8. 25** Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en cultivo de lechuga

### **8.13 Determinación de plaguicidas organoclorados en una chinampa tradicional**

Dado el espacio y los tiempos necesarios para obtener un producto, se optó por realizar un muestreo a los vegetales provenientes de 2 chinampas que se encuentran en proceso de transición para ser orgánicas; encontrándose altas concentraciones de  $\delta$  y  $\alpha$  BHC (Hexacloruro de benceno) (tablas 8.15 y 8.16); puesto que en el país no se cuenta con una legislación para alimentos, se utilizó el Codex de la FAO para tener un parámetro de comparación, apreciándose que la cantidad de plaguicida presente rebasa hasta 18 veces el parámetro establecido en el Codex.

Estudios realizados por otros autores, muestran también que el plaguicida en mayor concentración es el BHC en sus diferentes isómeros; una posible explicación podría deberse a la capacidad que tiene este plaguicida en forma comercial de emulsificar, lo cual lo hace de fácil acceso al cultivo juntamente con el transporte de nutrientes (Škrbic y Predojević, 2008).

Un parámetro importante que define las características de un plaguicida es el Koc (coeficiente de adsorción de carbono orgánico) este valor indica la adsorción de plaguicida en el suelo; mientras mayor es este valor la adsorción del plaguicida al suelo es mayor y por lo tanto la traslocación al producto; uno de los plaguicidas organoclorados con mayor Koc es el lindano (Odukkathil & Vasudevan, 2013) por lo que esto pudiera ser otra explicación por lo cual es el compuesto con mayor concentración encontradas en el producto final.

Dado que en la mayoría de los casos las concentraciones de plaguicidas presentes en el suelo son menores que la determinada en los vegetales puede suponerse que un gran porcentaje del plaguicida está siendo adsorbido por el vegetal.

Por otro lado, se aprecia que en los vegetales provenientes del productor 2 se tiene una mayor adsorción de plaguicidas en la lechuga que en las verdolagas, sin embargo, en este punto no se le puede atribuir al contenido lipídico, puesto que se sabe que de manera general, el contenido en las lechugas es menos de la mitad que el de las verdolagas (Murillo et al., 2014); por lo que en este caso se puede retomar la hipótesis del potencial de adsorción de compuestos altamente hidrofóbicos por el tallo y los cuales no son capaces

de ser metabolizados durante el desarrollo del cultivo y se acumulan en las paredes del vegetal (González et al., 2005).

Otro punto para destacar es que no con todos los plaguicidas se replicó este comportamiento por lo que podría suponerse que la adsorción estuviera más relacionada con la emulsión de la fórmula comercial que con el compuesto en si (Škrbic y Predojević, 2008).

**Tabla 8.15** Determinación de organoclorados en vegetales del productor 1

<b>Plaguicida</b>	<b>Lechugas (mg/kg)</b>	<b>Suelo (mg/kg)</b>
δ-BHC (Hexacloruro de benceno)	0.034 ± 0.032	0.005 ± 0.003
α-BHC (Hexacloruro de benceno)	0.185 ± 0.181	0.002 ± 0.002
β-BHC (Hexacloruro de benceno)	0.001 ± 0.001	0
Lindano	0.003 ± 0.004	0.003 ± 0.004
Heptacloro	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.003
Clordano	0.002 ± 0.002	5.73 x 10 <sup>-5</sup>
Aldrin	0.008 ± 0.005	0.012 ± 0.014
Paration	0.006 ± 0.005	0.00043923
Carbaril	0.002 ± 0.002	0.00015556
Heptacloro epóxido	0.01 ± 0.006	0.01 ± 0.01
Endosulfán α	0.007 ± 0.005	0.002 ± 0.001
o,p'-DDE (Dicloro difenil dicloro etileno)	0.022 ± 0.013	0.003 ± 0.003
o,p'-DDD (Dicloro difenil tricloro etano)	0.007 ± 0.012	0.0005
Endosulfán β	0.006 ± 0.002	0.001 ± 0.002
p,p'-DDE (Dicloro difenil dicloro etileno)	9.4 x 10 <sup>-5</sup>	0.001 ± 0.001
p,p'-DDT (Dicloro difenil tricloroetano)	0.002 ± 0.001	0.0001
Metoxicloro	0.125 ± 0.191	0.003 ± 0.003
Sulfato endosulfán	0.012 ± 0.009	0.01 ± 0.005
Mirex	0.002 ± 0.002	0.003 ± 0.003

**Tabla 8.16** Determinación de plaguicidas organoclorados en vegetales del productor 2

<b>Plaguicida</b>	<b>Lechugas (mg/kg)</b>	<b>Suelo (mg/kg)</b>	<b>Verdolagas (mg/kg)</b>	<b>Suelo (mg/kg)</b>
$\delta$ -BHC (Hexacloruro de benceno)	0.065 $\pm$ 0.054	0.0009 $\pm$ 0.002	0.019 $\pm$ 0.007	0.0007 $\pm$ 0.001
$\alpha$ -BHC (Hexacloruro de benceno)	0.129 $\pm$ 0.123	0	0.075 $\pm$ 0.038	0.0004
$\beta$ -BHC (Hexacloruro de benceno)	0.0001	0.0002	0	0.0002
Lindano	0.003 $\pm$ 0.001	0	0.002	0
Toxafeno	0.018 $\pm$ 0.021	0	0.022 $\pm$ 0.013	0
Malation	0	0	0.001 $\pm$ 0.002	0
Heptacloro	0.002 $\pm$ 0.002	0	0	0.0002
Clordano	0.0004	0	0.0004	0.0006
Aldrin	0.024 $\pm$ 0.028	0.016	0.019 $\pm$ 0.032	0.031 $\pm$ 0.02
Paration	0.014 $\pm$ 0.013	4.3 $\times 10^{-5}$	0.014 $\pm$ 0.006	0.001
Carbaril	0.0009	1.4 $\times 10^{-5}$	0.001	0.0002
Heptacloro epóxido	0.021 $\pm$ 0.018	0.0007	0.014 $\pm$ 0.009	0.002 $\pm$ 0.001
Endosulfán $\alpha$	0.009 $\pm$ 0.004	0.0004 $\pm$ 0.008	0.006 $\pm$ 0.005	0.001
o,p'-DDE (Dicloro difenil dicloro etileno)	0.029 $\pm$ 0.05	0.0004	0.022 $\pm$ 0.014	0.001
Dieldrin	0.003 $\pm$ 0.003	0	0.0009	4.4 $\times 10^{-5}$
o,p'-DDD (Dicloro difenil tricloro etano)	0.003 $\pm$ 0.003	8.6 $\times 10^{-6}$	0.002 $\pm$ 0.002	0
Endosulfán $\beta$	0.016 $\pm$ 0.021	0.001	0.004 $\pm$ 0.001	0.003 $\pm$ 0.001
p,p'-DDE (Dicloro difenil dicloro etileno)	0.016 $\pm$ 0.001	0	0.0001	6.9 $\times 10^{-5}$
p,p'-DDT (Dicloro difenil tricloroetano)	0.003 $\pm$ 0.001	0.0002 $\pm$ 0.001	0.001 $\pm$ 0.001	0.0002
Metoxicloro	0.013 $\pm$ 0.014	0	0	0.011 $\pm$ 0.019
Sulfato endosulfán	0.016 $\pm$ 0.01	0.008 $\pm$ 0.015	0.017 $\pm$ 0.013	0.007 $\pm$ 0.007
Mirex	0.003 $\pm$ 0.003	0.0002	0.002	0.0005

### 8.14 Evolución de los diferentes tratamientos en la degradación de endosulfán

Los diferentes tratamientos para la degradación de endosulfán demostraron que la mayor degradación del producto está dada por *P. crustosum* al cabo de un mes con 92.93 % de conversión (Fig. 8.26 y 8.27), seguida por el tratamiento con el inóculo CMCN con una conversión del 85.49 % después de 2 meses.

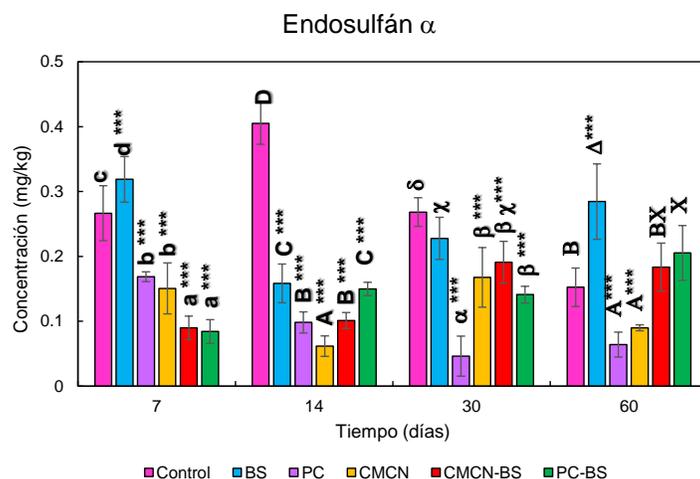
La menor cantidad de sulfato endosulfán (<0.1 ppm), el cual es considerado el metabolito más tóxico; fue apreciada en los sistemas bio aumentados con la tecnología CMCN solo y con adición de biosurfactante después de 14 días; así como el tratamiento con *P. crustosum* y la adición de biosurfactante (Fig. 8.28). De aquí, la importancia de estudiar no solo el compuesto inicial en tratamientos de degradación, como en otros trabajos (Odukkathil et al., 2013), sino también sus metabolitos secundarios.

Un estudio similar sobre degradación de endosulfán en suelos lo realizó el grupo de trabajo de Goswami et al., (2009) quienes trataron con *Aspergillus sydoni* un suelo contaminado con endosulfán encontrando que al cabo de 60 días se había eliminado casi un 90 % de endosulfán, pero se tenía un 28 % de sulfato endosulfan.

De manera general se observó que la degradación de endosulfán tanto por *P. crustosum* como por el inóculo CMCN siguen la ruta oxidativa, por lo que el último metabolito encontrado después de la extracción (EPA 3546) corresponde al endosulfán mono alcohol (Fig. 8.29). También metabolitos de la ruta hidroxidativa fueron encontrados (endosulfán éter y lactona), los cuales estaban en mayor concentración en los tratamientos que fueron adicionados con BS (Fig. 8.30 y 8.31). Esto puede atribuirse a que los microorganismos nativos del suelo son capaces de hidroxilar el plaguicida y el contacto de este con el BS lo hace accesible para dichos microorganismos; sin embargo, estos tratamientos no fueron igual de eficaces que los bio aumentados.

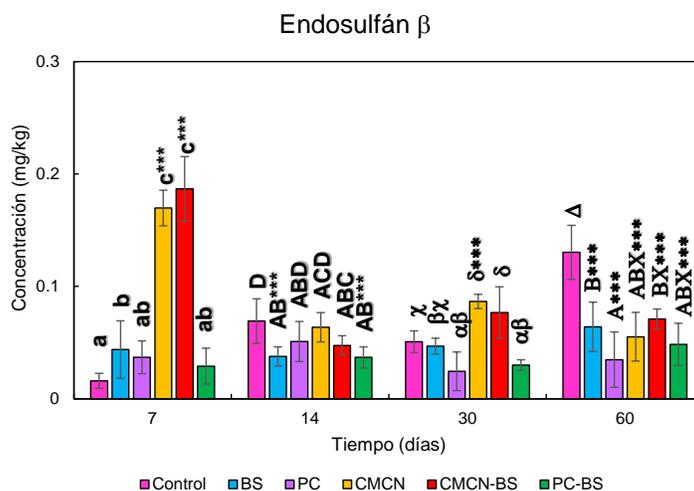
Otros trabajos sobre degradación de endosulfán sugieren el uso de co-cultivos para realizar la degradación de endosulfán generando metabolitos menos tóxicos (Kamei et al., 2011) como el endosulfán éter o lactona, en este tipo de cultivos se tiene un primero un microorganismo que oxida el endosulfán a sulfato y un segundo microorganismo que hidroxila u oxida el sulfato a un metabolito menos tóxico. Una situación similar pudo haber

ocurrido con el inóculo CMCN, lo que explicaría las menores concentraciones de sulfato endosulfán de los sistemas en un corto tiempo (14 días). La posible explicación del funcionamiento de este sistema es que los hongos filamentosos desarrollados en el residuo sean capaces de oxidar el endosulfan a sulfato y posteriormente los demás microorganismos del residuo cítrico puedan acelerar el metabolismo hacia la producción del alcohol.



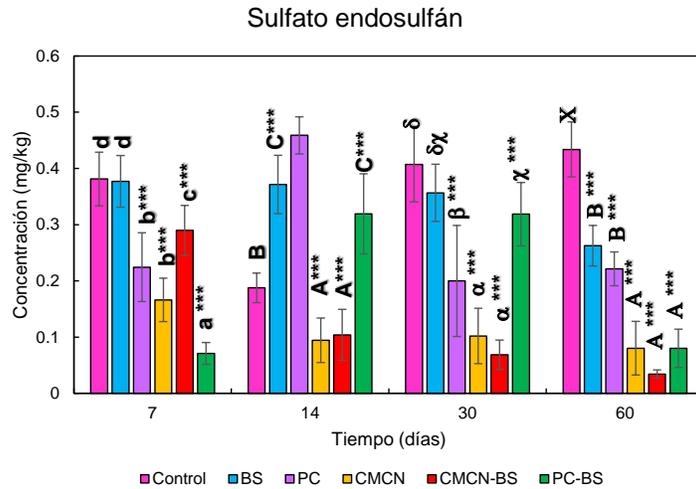
Letras diferentes: Diferencia estadística significativa con prueba LSD; \*\*\* : Diferencia estadística significativa con prueba de Dunnet. Análisis estadístico realizado por día por tratamiento.

**Fig. 8. 26** Evolución del endosulfán  $\alpha$  en los diferentes tratamientos de biorremediación.



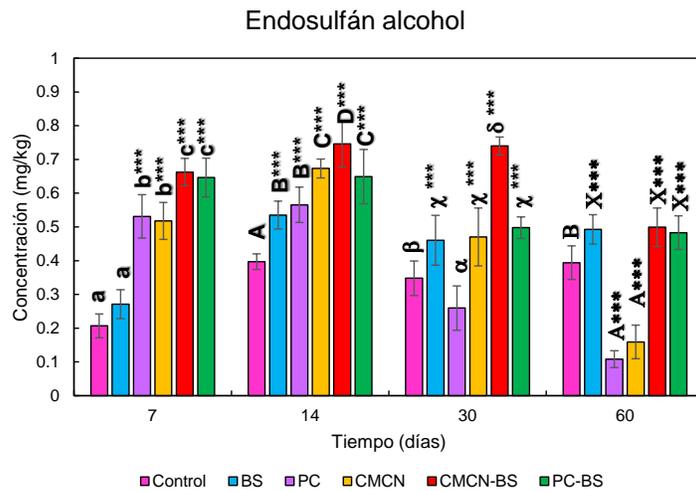
Letras diferentes: Diferencia estadística significativa con prueba LSD; \*\*\* : Diferencia estadística significativa con prueba de Dunnet. Análisis estadístico realizado por día por tratamiento.

**Fig. 8.27** Evolución del endosulfán  $\beta$  en los diferentes tratamientos de biorremediación.



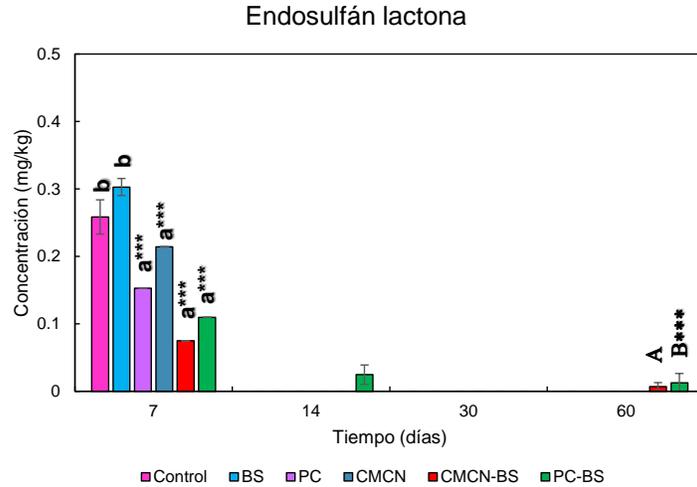
Letras diferentes: Diferencia estadística significativa con prueba LSD; \*\*\* : Diferencia estadística significativa con prueba de Dunnet. Análisis estadístico realizado por día por tratamiento.

**Fig. 8.28** Evolución del sulfato endosulfán en los diferentes tratamientos de biorremediación



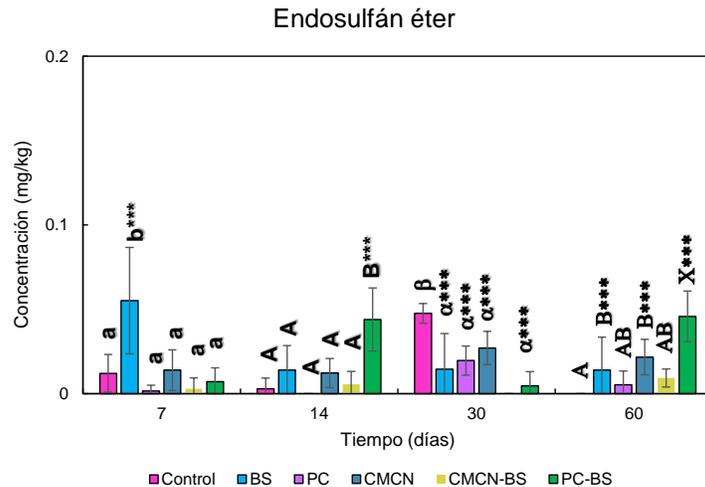
Letras diferentes: Diferencia estadística significativa con prueba LSD; \*\*\* : Diferencia estadística significativa con prueba de Dunnet. Análisis estadístico realizado por día por tratamiento.

**Fig.8.29** Evolución del endosulfán alcohol en los diferentes tratamientos de biorremediación



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa con prueba LSD; \*\*\* : Diferencia estadística significativa con prueba de Dunnet. Análisis estadístico realizado por día por tratamiento.

**Fig.8.30** Evolución del endosulfán lactona en los diferentes tratamientos de biorremediación



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa con prueba LSD; \*\*\* : Diferencia estadística significativa con prueba de Dunnet. Análisis estadístico realizado por día por tratamiento.

**Fig. 8.31** Evolución del endosulfán éter en los diferentes tratamientos de biorremediación

Al comparar las tasas de conversión con las de otros hongos estudiados para la degradación de endosulfán, se puede apreciar que las tasas obtenidas están en el intervalo de los valores reportados por otros autores (Tabla 2.3); donde si bien en algunos sistemas el tiempo de degradación es menor, esto pudiera estar relacionado con las propiedades

fisicoquímicas del suelo, pues en un sistema como el usado con alto contenido de arcilla los compuestos xenobióticos y BS se quedan secuestrados en el mismo convirtiendo a los procesos degradativos menos eficientes (Hosseininoosheri et al., 2016).

Además, se debe considerar que la salinidad del suelo también debe jugar un papel importante en el desarrollo del cultivo y en la eficiencia del BS como se pudo apreciar en la evaluación a condiciones extremas en la sección 8.6.

Tomando las consideraciones anteriores se podría concluir que tanto el tratamiento con el inóculo CMCN como con el microorganismo *P. crustosum* son eficientes en la remoción de endosulfán en un suelo arcilloso y salino lo que refleja un potencial para ser usado como una tecnología *In situ*.

También es posible concluir que la adición de BS no tiene mayor implicación en el tratamiento de BR, probablemente porque ya es producido de manera *In situ* por los inoculos.

#### **8.15 Evaluación de la producción de biosurfactante *In situ***

Una vez determinados los mejores tratamientos (con *P. crustosum* e inóculo CMCN) para la remoción de endosulfán, se decidió evaluar la producción de BS *In situ*. Para esto, 10 g de suelo tratado fueron diluidos en 20 mL de agua destilada y homogenizados con agitación por 5 minutos. La mezcla fue filtrada y al líquido resultante se le midió actividad tensoactiva y emulsificante. Las muestras de suelo correspondían a los días 7, 14, 21 y 30; encontrándose la mayor actividad a los 14 días (Tabla 8.17) como se había apreciado en los sistemas en de *P. crustosum* en medio líquido descritos en el apartado 8.4.

**Tabla 8.17** Evaluación indirecta de la producción de BS *In situ*

Días	CMCN		<i>P. crustosum</i>	
	T.S (mN/m)	E <sub>24</sub> (%)	T.S (mN/m)	E <sub>24</sub> (%)
7	64.67 ± 0.47	16.67 ± 0	67.66 ± 0.47	8.89 ± 0.16
14	65 ± 0	16.67 ± 0	64.33 ± 0.47	16.67 ± 0
21	63.33 ± 0.47	0	70 ± 0	0
30	63.5 ± 0.41	0	67.33 ± 0.47	0

El bio producto extraído a los 14 días fue purificado parcialmente con una precipitación ácida, seguida de una extracción con cloroformo:etanol (2:1) con la finalidad de ver si las propiedades se veían maximizadas, como se realizó en medio líquido; encontrándose una disminución de la TS de 72 hasta  $55.33 \pm 0.58$  mN/m tanto para el BS segregado por el inoculo CMCN como por *P. crustosum*; sin embargo la actividad emulsificante, se vio inhibida con esta purificación, pues después de la misma ya no se encontró actividad.

Esto puede deberse a que el tiempo de anaquel del bio producto sea corto para mantener dicha propiedad o a que los ácidos grasos que favorecen que el bio producto emulsione no hayan sido extraídos con el tratamiento realizado (Ghannam, 2005) a pesar de que se utilizó el mismo método para extraer el BS del medio líquido y con este si fue eficiente. Lo anterior también puede deberse a que la estructura del BS pudo haber sido modificada por su desarrollo *in situ*, ya que los nutrientes fueron diferentes (Soberón-Chávez, 2004).

De cualquier manera, la producción *In situ* del biosurfactante fue comprobada de manera indirecta con la disminución de la tensión superficial de hasta 17 unidades; lo que podría explicar que los microorganismos aumentados en el sistema pueden acceder al plaguicida para posteriormente metabolizarlo, a pesar de que es un compuesto de naturaleza hidrofóbica, como sucede en los tratamientos descritos en la sección 8.4.

Otra posible explicación por la cual la actividad tensoactiva fue menor en sólido que en líquido está dada por los fenómenos de difusión, por ello un mismo microorganismo puede producir un BS con mayor actividad tensoactiva en cultivo líquido respecto al sólido (Hosseininoosheri et al., 2016).

### 8.16 Fitotoxicidad en frijoles germinados en suelo tratado simultáneamente

Con la finalidad de comprobar si el tratamiento de BR tenía un algún efecto en el desarrollo del vegetal, se germinó la planta de frijol (por su rapidez en la germinación y la mayor cantidad de biomasa generada) a la par que se llevaban a cabo los tratamientos con el inóculo CMCN y *P. crustosum* sobre el suelo contaminado con endosulfán, encontrándose diferencia estadística significativa mediante el método de Tukey; en el índice de germinación, longitud de parte aérea y peso de raíz de los tratamientos con el control (Tabla 8.18).

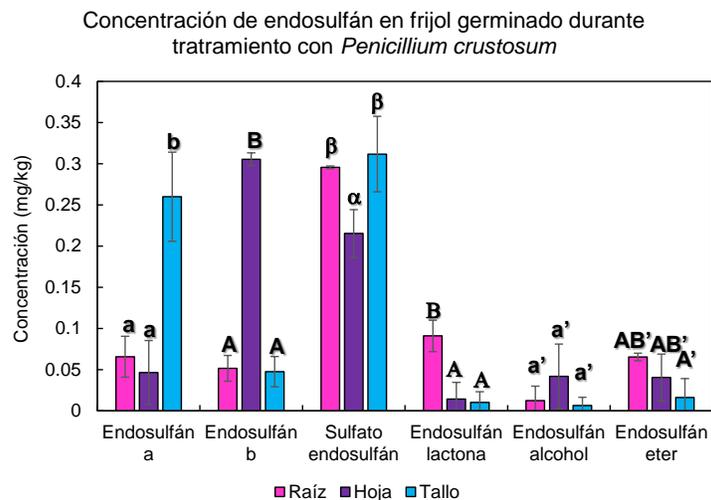
Además, se apreció una traslocación de plaguicida y formación de metabolitos secundarios en los cultivos (Figs. 8.32 y 8.33). El daño fitotóxicos pudiera atribuirse a la traslocación de estos compuestos comprometiendo la bioquímica del vegetal viéndose reflejado en un menor tamaño de las plántulas y no a los tratamientos de BR.

Dado este comportamiento, se optó por realizar otros experimentos que consistieron en llevar a cabo primero el tratamiento de biorremediación y posteriormente germinar las semillas con la finalidad de que la concentración de xenobiótico sea casi nula en el suelo y buscando evaluar el efecto real de los tratamientos en el desarrollo del cultivo, esperando que sea un mejorador de estos.

**Tabla 8.18** Pruebas de fitotoxicidad en plantas de frijol germinadas en suelo con tratamiento de BR simultáneamente.

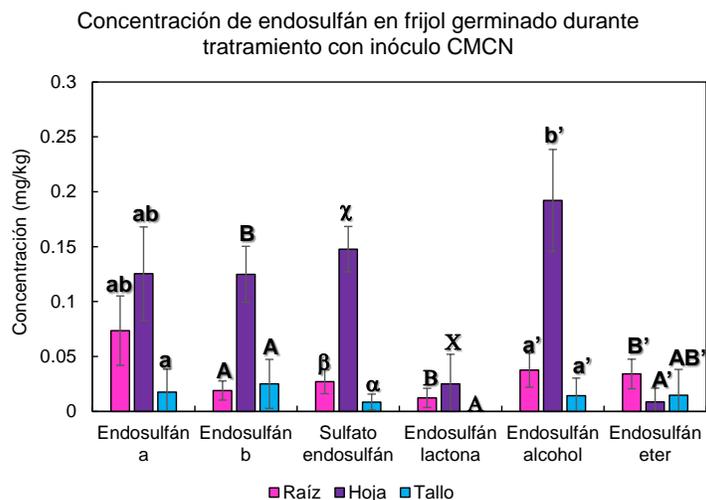
Parámetro	Control	CMCN	<i>P. crustosum</i>
Índice de germinación (%)	80 ± 16.33 <sup>b</sup>	66.67 ± 0 <sup>a</sup>	66.67 ± 0 <sup>a</sup>
Longitud de raíz (cm)	5.54 ± 0.66 <sup>a</sup>	5.55 ± 0.54 <sup>a</sup>	5.83 ± 0.9 <sup>a</sup>
Longitud de parte aérea (cm)	20.83 ± 2.44 <sup>b</sup>	14 ± 1.38 <sup>a</sup>	12.58 ± 1.92 <sup>a</sup>
Peso de raíz (g)	0.77 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.15 <sup>a</sup>
Peso de parte aérea (g)	1.49 ± 0.37 <sup>a</sup>	1.57 ± 0.48 <sup>a</sup>	1.93 ± 0.32 <sup>a</sup>

- Letras diferentes indican diferencia estadística significativa con comparación de medias de Tukey.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa. Análisis estadístico realizado por metabolito.

**Fig. 8.32** Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en cultivo de frijol germinado durante la biorremediación con *P. crustosum*



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa. Análisis estadístico realizado por metabolito.

**Fig. 8.33** Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en cultivo de frijol germinado en durante la biorremediación con inóculo CMCN

Es posible apreciar una mayor concentración de xenobióticos en el cultivo con *P. crustosum* que con el inóculo CMCN (Figs. 8.32 y 8.33), teniendo la mayor concentración de endosulfán y sulfato en las hojas asociado a la volatilización del compuesto.

El tratamiento con el inoculo CMCN demostró menores concentraciones de endosulfán y metabolitos (Figura 8.33); encontrándose las concentraciones más altas en el tallo, por lo que podría suponerse que el inoculo está activando algunas barreras bioquímicas para que el plaguicida no afecte al vegetal (Bidlan et al., 2004).

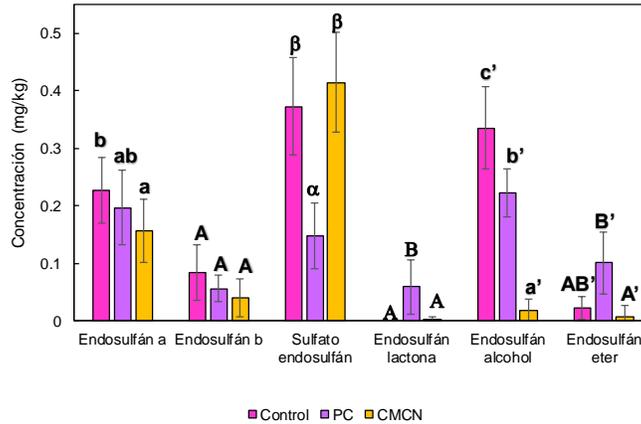
Pese a que la acumulación de xenobióticos fue diferente en ambos tratamientos el daño fitotoxicológico fue semejante en ambos casos a nivel morfológico.

La cuantificación de endosulfán y sus metabolitos fue realizada en el suelo (Fig. 8.34); encontrando la menor concentración de sulfato endosulfán en el suelo tratado con *P. crustosum*; aparentemente este metabolito está translocando al vegetal.

Por otro lado, la concentración del plaguicida sin biotransformar es mayor en el suelo que en los cultivos lo que puede significar que el xenobiótico puede seguir translocando hasta el producto final. Metabolitos presentes de la ruta oxidativa e hidroxidativa fueron encontrados en ambos tratamientos, sin embargo, estos se encontraron en mayor concentración en el sistema con *P. crustosum*; comportamiento asociado a la producción de BS del microorganismo, lo que hace accesible el plaguicida a los microorganismos nativos del suelo.

Altas concentraciones de sulfato endosulfán fueron encontradas en el suelo BR CMCN, donde el cultivo presentó la mayor concentración de este en el tallo, confirmando la hipótesis de que alguna activación bioquímica está realizando una especie de barrera para la traslocación de este compuesto.

Concentración de endosulfán y sus metabolitos en suelos con tratamiento de biorremediación y germinación de plántulas



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa. Análisis estadístico realizado por metabolito.

**Fig. 8.34** Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en suelos biorremediados y germinados

### 8.17 Fitotoxicidad en frijoles germinados en suelo biorremediado previamente

Con la finalidad de apreciar si el tratamiento de BR tiene algún efecto en el desarrollo del cultivo y excluir el efecto del plaguicida y sus metabolitos en la toxicidad, se realizaron primero los tratamientos de BR y posteriormente se pusieron a germinar las semillas de las plántulas, encontrándose diferencia estadística significativa en el peso de la raíz y la longitud de parte aérea; obteniendo una ligera mejora en los tratamientos del suelo biorremediado (tabla 8.19), este comportamiento puede estar relacionado con una mayor disposición de nutrientes como se demuestra en la caracterización fisicoquímica del suelo (sección 8.18).

**Tabla 8.19** Pruebas de fitotoxicidad en plantas de frijol germinadas en suelo BR previamente.

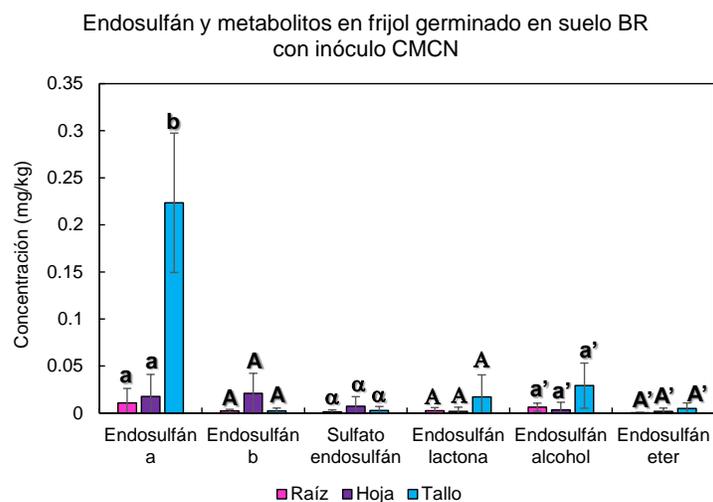
Parámetro	Control	CMCN	<i>P. crustosum</i>
Índice de germinación (%)	87.5 ± 12.5 <sup>a</sup>	90.63 ± 12.1 <sup>a</sup>	92.5 ± 11.46 <sup>a</sup>
Longitud de raíz (cm)	7.37 ± 1.27 <sup>a</sup>	7.03 ± 1.4 <sup>a</sup>	6.86 ± 1.56 <sup>a</sup>
Longitud de parte aérea (cm)	18.6 ± 2.97 <sup>a</sup>	23.14 ± 1.42 <sup>c</sup>	21.49 ± 2.04 <sup>b</sup>
Peso de raíz (g)	0.47 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.28 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.15 <sup>a</sup>
Peso de parte aérea (g)	1.82 ± 0.56 <sup>a</sup>	2.04 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.79 ± 0.47 <sup>a</sup>

- Letras diferentes indican diferencia estadística significativa con comparación de medias de Tukey.

Adicionalmente se cuantificó la cantidad de plaguicida residual en los cultivos encontrándose una menor cantidad de endosulfán y sus metabolitos, en comparación de los tratamientos en los que se llevó la biorremediación y se germinó el cultivo simultáneamente (Figs. 8.35 y 8.36). En ambos casos el compuesto con mayor concentración (< 0.2 ppm) fue el endosulfán  $\alpha$  y estuvo presente casi en su totalidad en el tallo; para el tratamiento CMCN los demás compuestos se encontraron en concentraciones menores a 0.05 mg/kg lo cual no involucra un riesgo a la salud; mientras que con el microorganismo *P. crustosum* se encontró endosulfán mono alcohol en casi 0.1 ppm y los demás metabolitos en concentraciones menores a 0.05 mg/kg, sin embargo estos valores tampoco involucran un daño a la salud pública.

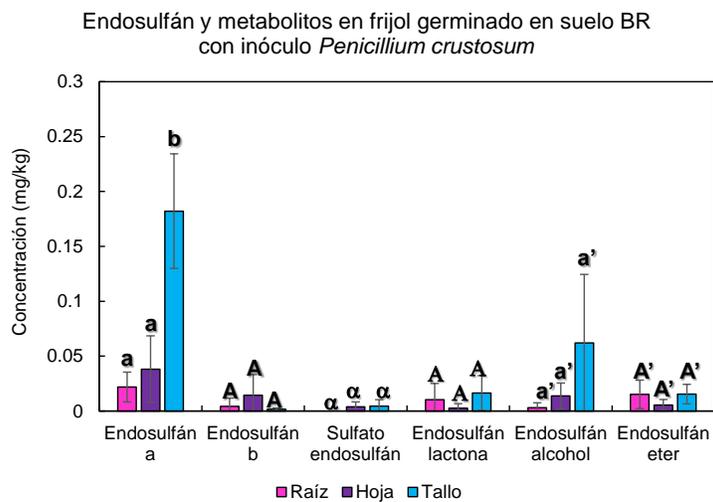
Al comparar los resultados obtenidos con los cultivos donde se llevó a cabo la germinación y biorremediación simultáneamente, se aprecia una mejora tanto en la calidad de la plántula, así como en la concentración de plaguicida (hasta un 80 %); teniendo 0,1 ppm menos de plaguicida inicial y una cantidad casi nula de sulfato endosulfán (metabolito más tóxico). Por cuestiones de tiempo, no se germinó la planta hasta producto final, pero podría suponerse que este tendría la misma o menor concentración que la presentada en las hojas lo cual está dentro de los rangos de la normativa internacional.

El hecho de encontrar nuevamente la mayor concentración en el tallo y que en este punto sea replicable en ambos tratamientos, confirma lo discutido anteriormente sobre la barrera bioquímica que está activando el vegetal como mecanismo de defensa.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa. Análisis estadístico realizado por metabolito.

**Fig. 8.35** Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en cultivo de frijol germinado en suelo biorremediado con inóculo CMCN.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa. Análisis estadístico realizado por metabolito.

**Fig. 8.36** Cuantificación de endosulfán y sus metabolitos en cultivo de frijol germinado en suelo biorremediado con *P. crustosum*.

### 8.18 Caracterización fisicoquímica final del suelo biorremediado

Con la finalidad de apreciar si el proceso de biorremediación, además de la remoción de plaguicidas tuvo algún efecto en la calidad del suelo, se le realizó una caracterización fisicoquímica final, encontrándose que los tratamientos favorecieron la reducción de la salinidad hasta en 20 unidades (tabla 8.20), así como un aumento de casi el doble de carbono y materia orgánicos, lo que convierte al suelo tratado como un suelo más fértil.

Si bien la relación C/N ideal en un suelo es entre 15 y 20, el tener relaciones arriba de 20 implica un mayor ingreso de carbohidratos para el vegetal, de los cuales se sabe que más del 50% se destina al desarrollo de raíces la planta aumentando su biomasa, mejorando el movimiento de aire, agua y nutrimentos al aumentar la capacidad de intercambio catiónico asimilando de una forma más soluble los minerales que se encuentran en él (Ortiz-Rojas, 2010).

**Tabla 8.20** Propiedades fisicoquímicas de los suelos tratados.

Propiedad	Inicial	<i>P. crustosum</i>	CMCN
pH	7.35 <sup>c</sup>	6.8 <sup>a</sup>	7 <sup>b</sup>
Conductividad (dS/m)	27.16 <sup>b</sup>	7.63 <sup>a</sup>	7.87 <sup>a</sup>
Humedad (%)	90.67 ± 5.43 <sup>b</sup>	86.06 ± 0.75 <sup>a</sup>	89.22 ± 0.48 <sup>ab</sup>
Carbono orgánico (%)	12.51 ± 0.15 <sup>a</sup>	23.38 ± 0.83 <sup>b</sup>	23.71 ± 0.33 <sup>b</sup>
Materia orgánica (%)	21.57 ± 0.25 <sup>a</sup>	40.31 ± 1.43 <sup>b</sup>	40.88 ± 0.56 <sup>b</sup>
Fósforo (mg/kg)	10.72 ± 0.53 <sup>a</sup>	41 ± 2.1 <sup>b</sup>	49.78 ± 2.19 <sup>b</sup>
Nitrógeno total (%)	0.80 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.38 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.02 <sup>b</sup>
Arena (%)	33.04 <sup>a</sup>	37 <sup>b</sup>	45.72 <sup>c</sup>
Arcilla (%)	36.24 <sup>c</sup>	31.56 <sup>b</sup>	29.56 <sup>a</sup>
Limo (%)	30.72 <sup>b</sup>	31.44 <sup>b</sup>	24.72 <sup>a</sup>
Clasificación del suelo	Franco – Arcilloso	Franco – Arcilloso	Franco – Arcilloso

Una posible explicación por la cual la fertilidad del suelo fue aumentada se puede atribuir a que los microorganismos inducidos interactúen con las raíces para favorecer la captación de nutrientes (Wakelin et al., 2004) específicamente el género *Penicillium* ha sido reportado como solubilizador de fosfatos, lo cual favorece en gran medida al desarrollo de cultivos por

el ingreso de iones  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  los cuales en suelos salinos se encuentran formando complejos de sales con los diferentes iones relacionados con la salinidad punto en el cual se encuentra una interacción con la formación de ácidos orgánicos ya que estos pueden estar actuando como agentes quelantes o secuestradores de iones  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , entre otros (Romero-Fernández et al., 2019) dejando libres los complejos de fósforo para ser asimilados por los cultivos.

Sin embargo, cabe resaltar que en el inoculo CMCN, deben estar presentes otros microorganismos solubilizadores de fosfatos, ya que existe una diferencia de casi 9 mg/kg entre ambos tratamientos; lo que podría estar relacionado con un mayor peso de raíz en los cultivos germinados en el suelo tratado con este inoculo pues se sabe que este elemento ingresa al cultivo a través de las raíces (Informaciones agronómicas #36, IPNI).

Existen reportes en los cuales se ha encontrado una disminución en el crecimiento de la raíz, expresándose en una menor masa radicular ocasionado por una deficiencia de fósforo (Informaciones agronómicas #36, IPNI).

El único macronutriente en el que se encontró una disminución en su concentración fue el nitrógeno, sin embargo, de acuerdo con la NMX-021 se sigue teniendo un valor elevado del mismo. Este comportamiento puede estar relacionado con la bioaumentación ocurrida durante el proceso de biorremediación, ya que los microorganismos pueden estar utilizando los compuestos nitrogenados para su desarrollo, pues como se ha discutido anteriormente la fuente de nitrógeno juega un papel importante en la formación de proteínas, el crecimiento y producción de enzimas (Xia et al., 2013).

Además, al igual que en otros trabajos se vio un cambio en la estructura del suelo disminuyendo su compactación, aumentando el contenido de arena y disminuyendo el de arcilla y limo lo cual provoca una mayor permeabilidad y un mejor transporte de nutrientes (FAO, 2019). Lo anterior puede atribuirse a la liberación de compuestos de azufre favoreciendo el intercambio del sodio por el calcio mejorando las propiedades fisicoquímicas del suelo y aprovechando las sales de sodio que pudieran estar ocasionando la salinidad, lo que se ve representado como una disminución de la conductividad (Zúñiga Escobar et al., 2011).

Relacionado a la estructura del suelo el grupo de trabajo de Romero-Fernández et al., 2019; apreciaron que al aumentar el contenido de fósforo en el suelo se disminuía el porcentaje de arcilla; comportamiento que fue similar en nuestros resultados.

### **FASE III**

#### **8.19 Respuestas a estrés abiótico del material seco cultivado en el lab 44 de compuestos Xenobióticos del CINVESTAV Zacatenco**

El material seco de *Phaseolus leptostachyus* germinado en el CINVESTAV, Zacatenco, Cd. De México, se colocó en la estufa a 60°C durante 3 días para eliminar la posible humedad que pudieran haber adquirido durante el transporte. Pasado ese tiempo se prepararon viales entre 0.05 y 0.1 g de muestras para triturar y utilizarlos en diferentes análisis.

##### **8.19.1 Cuantificación de iones**

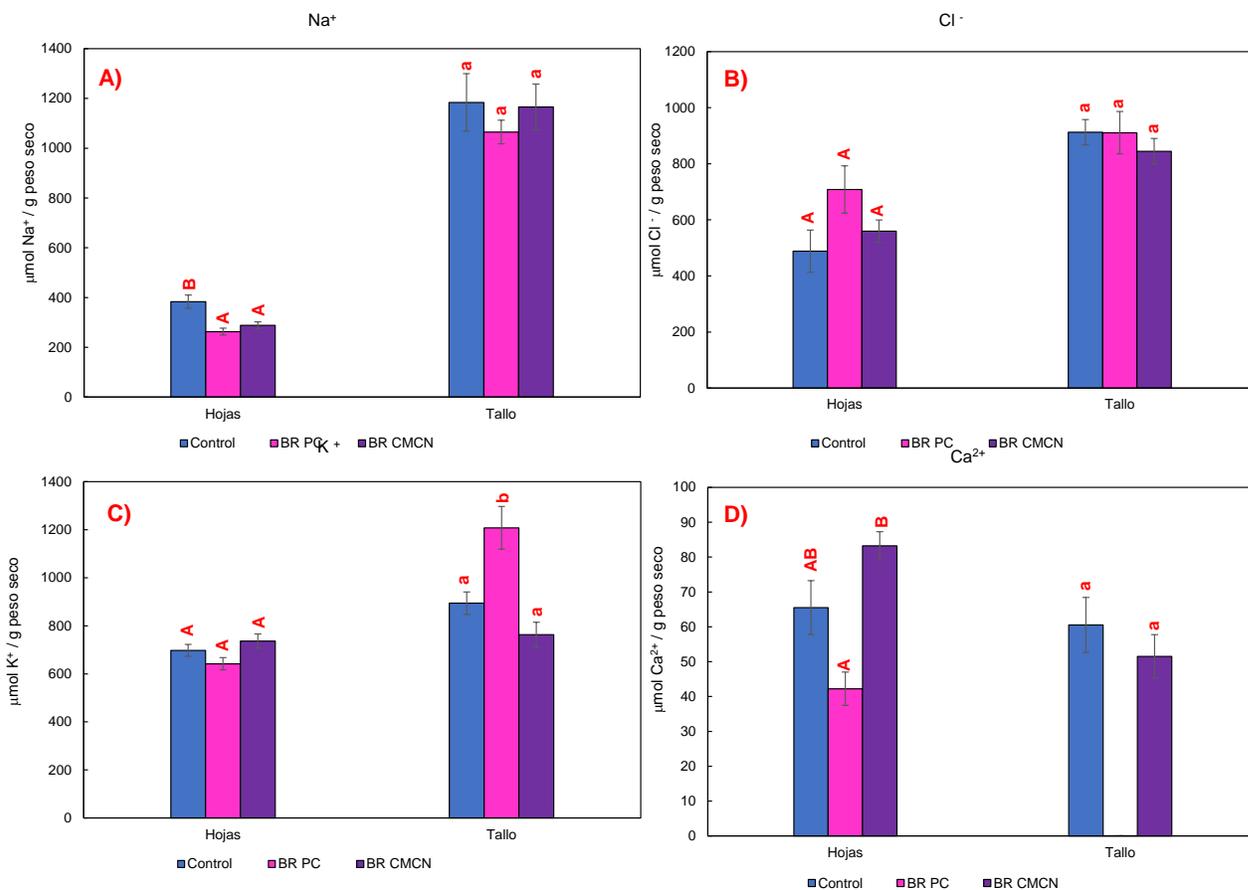
Al material seco del punto 8.19 se le cuantificó la concentración de iones Na<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> con la finalidad de apreciar si los tratamientos de BR tenían algún efecto en el ingreso de estos iones a la planta, lo que pudiera estar relacionado con su mejora.

La figura 8.37 A) muestra una disminución en la concentración de sodio en las hojas en los tratamientos con respecto a los controles, lo que representa un bloqueo en el transporte de este ion como ha sido reportado por otros autores para el género *Phaseolus* (Al Hassan et al., 2016).

La fig. 8.37 C) muestra un aumento en la concentración de potasio mientras disminuye el sodio, este es un comportamiento que ha sido reportado por otros autores y a su vez pudiera estar relacionado con el crecimiento de la planta; pues este elemento es un macronutriente que está relacionado con la forma, color y tamaño del cultivo (Yin et al., 2018).

Con el cloro ocurrió un comportamiento similar que, con el potasio, al disminuir el sodio, este aumentó (Figura 8.37 B), sin embargo, no se apreció diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

Finalmente, en cuanto al calcio, este catión al estar en concentraciones bajas, no se le puede atribuir algún tipo de efecto salino al cultivo; lo que es posible notar es que la menor concentración de este fue apreciada en los tratamientos biorremediados con el inóculo PC.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa. Análisis estadístico realizado por grupo por ion.

Control: suelo sin ningún tratamiento; BR PC y BR CMCN: suelos con endosulfán biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente. A) Na<sup>+</sup>, B) Cl<sup>-</sup>, C) K<sup>+</sup>, D) Ca<sup>2+</sup>

**Fig. 8.37** Cuantificación de iones mono y divalentes relacionados con la salinidad en hojas y tallo de cultivo seco de *P. leptostachyus* en invernadero (temperatura: 35°C; HR: 85%), cultivado CINESTAV, Zacatenco.

## 8.19.2 Cuantificación de osmolitos

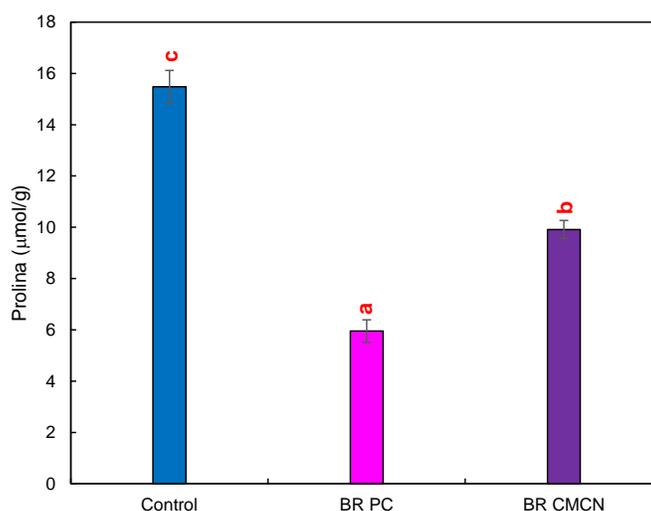
### 8.19.2.1 Cuantificación de prolina

Al mismo material seco utilizado en la sección 8.19, se le cuantificó el contenido de prolina con la finalidad de ver que tan estresado estaba el cultivo antes y después de los

tratamientos de biorremediación, encontrando que el tratamiento con el microorganismo *P. crustosum* reduce los niveles de este osmolito en la planta en más del 60%, mientras que el tratamiento con inóculo CMCN solamente lo reduce en 35% (Fig. 8.38)

Se sabe que la prolina es un aminoácido que tiende a acumularse en plantas del género *Phaseolus* cuando estas se encuentran bajo algún tipo de estrés, por lo que puede ser considerado un marcador bioquímico de estrés (Al Hassan et al., 2016).

La función de la prolina es realizar un ajuste osmótico en condiciones de estrés, como osmoprotector directo (estabilización de membranas, proteínas y otras estructuras macromoleculares), y molécula señalizadora (Hoai et al. 2003).



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; BR PC y BR CMCN: suelos con endosulfán biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente

**Fig. 8.38** Cuantificación de prolina en hojas secas de *P.leptostachyus* en invernadero (temperatura: 35°C; HR: 85%), cultivado CINESTAV, Zacatenco.

A pesar de que los valores de prolina disminuyeron en la planta cultivada con los suelos tratados por biorremediación, los valores encontrados en el control son más altos que los reportados por Zengin et al., (2005) para el género *Phaseolus*. Lo anterior, puede ser atribuido a que a pesar de que las semillas de frijol utilizadas provienen de la misma familia,

pertenecen a 2 genotipos diferentes, razón por la cual unas generen más este aminoácido y no necesariamente por resistencia o estrés.

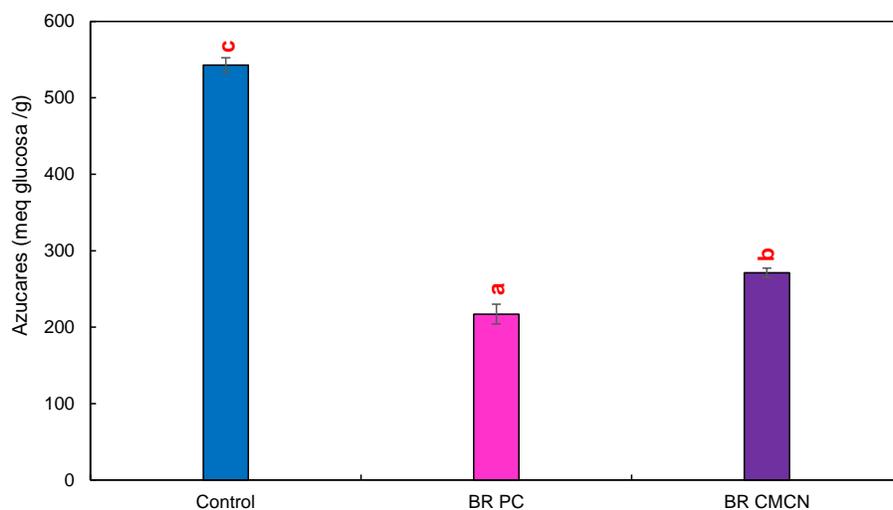
Otra explicación está dada por el tipo de suelo control ya que este suelo es un suelo salino (CE: 27.16 dS/m), lo que implica que el cultivo se está desarrollando bajo condiciones de estrés. El valor reportado para el suelo control (suelo sin ningún contaminante) del trabajo de Zengin et al., (2005) fue de 1.2  $\mu\text{mol/g}$  y 2  $\mu\text{mol/g}$  en un suelo con una concentración de 0.6 mM de mercurio, 3 veces menos que el mínimo encontrado en este trabajo.

Tomando en cuenta estos valores y considerando la disminución de prolina en los cultivos con suelos biorremediados, se podría concluir que las condiciones del suelo contaminado y sin tratar generan un mayor estrés en los cultivos de frijol por lo que producen este aminoácido como un mecanismo de protección.

#### **8.19.2.2 Cuantificación de azúcares**

A los cultivos secos de *P. leptostachyus*, también se le cuantificó el contenido de azúcares, ya que se tienen reportes de un aumento en azúcares en cultivos germinados bajo condiciones de estrés (Boscaiu et al., 2008), como una especie de autorregulación del cultivo. Se observó, al igual que en la prolina una menor concentración de azúcares en los cultivos germinados con los suelos biorremediados (Fig. 8.39).

La disminución de los niveles de azúcares está relacionada con los cambios en los niveles individuales de los carbohidratos y por lo tanto en el desarrollo del cultivo dada las múltiples funciones biológicas de estos compuestos como productos de fotosíntesis directa (Morosan et al., 2017), componentes del metabolismo primario y moléculas reguladoras; lo que implica que un cultivo en condiciones óptimas necesita generar una menor concentración de dichos carbohidratos.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; BR PC y BR CMCN: suelos con endosulfán biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente

**Fig. 8.39** Cuantificación de azúcares en hojas secas de *P.leptostachyus* en invernadero (temperatura: 35°C; HR: 85%), cultivado CINESTAV, Zacatenco.

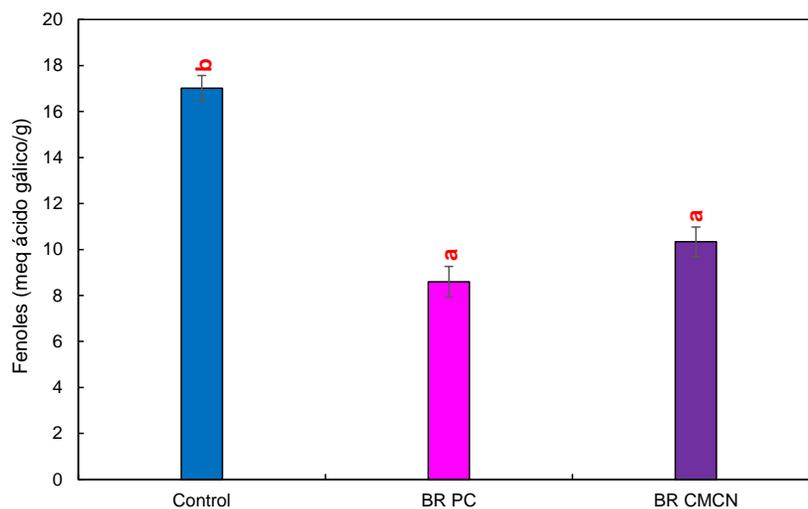
### 8.19.3 Cuantificación de antioxidantes no enzimáticos

#### 8.19.3.1 Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides

Del mismo material del punto 8.19, se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides presentes en la planta, con la finalidad de evaluar si el estrés al que fue sometido el cultivo por la presencia de endosulfán, fue capaz de activar la 2ª defensa antioxidante del vegetal. Se observó una menor concentración de compuestos fenólicos y flavonoides en los cultivos germinados en los suelos biorremediados (Figs. 8.40 y 8.41), comparada con el cultivo germinado en suelo sin tratar.

Los compuestos fenólicos y flavonoides tienden a ser inocuos en las plantas, ya que de manera general son producidos por éstas como componentes estructurales de su pared celular. Además, estos compuestos se desarrollan en procesos como el transporte de auxina y específicamente los flavonoides estimulan la formación de polen; sin embargo, cuando un cultivo es expuesto a especies reactivas de oxígeno como peróxidos, ozono o

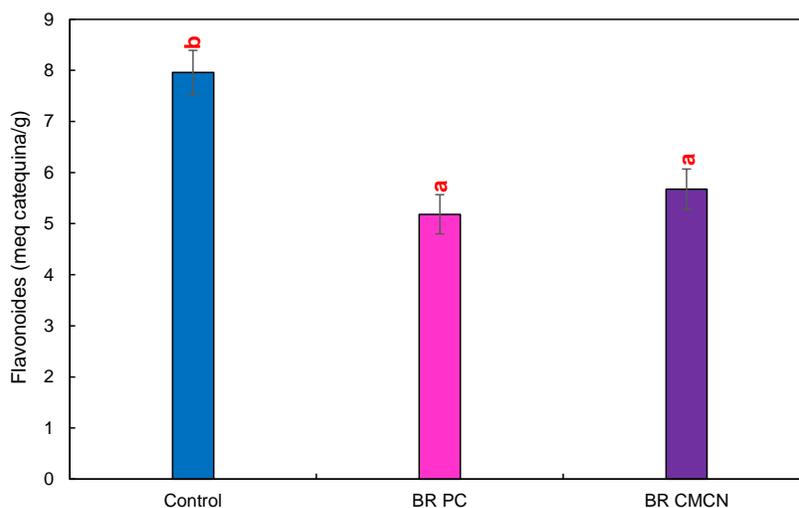
radicales hidroxilos, entre otros, los compuestos flavonoides se activan incrementando su concentración (Bautista et al., 2016).



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; BR PC y BR CMCN: suelos con endosulfán biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente

**Fig. 8.40** Cuantificación de compuestos fenólicos en hojas secas de *P.leptostachyus* en invernadero (temperatura: 35°C; HR: 85%), cultivado CINESTAV, Zacatenco.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; BR PC y BR CMCN: suelos con endosulfán biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente

**Fig. 8.41** Cuantificación de flavonoides en hojas secas de *P.leptostachyus* en invernadero (temperatura: 35°C; HR: 85%), cultivado CINESTAV, Zacatenco.

En general, se observó una disminución en los antioxidantes no enzimáticos producidos en los cultivos germinados en los suelos biorremediados, en comparación con el suelo sin tratar; lo que se vio reflejado en las mejoras de crecimiento del cultivo de *P. leptostachyus* (sección 8.17)

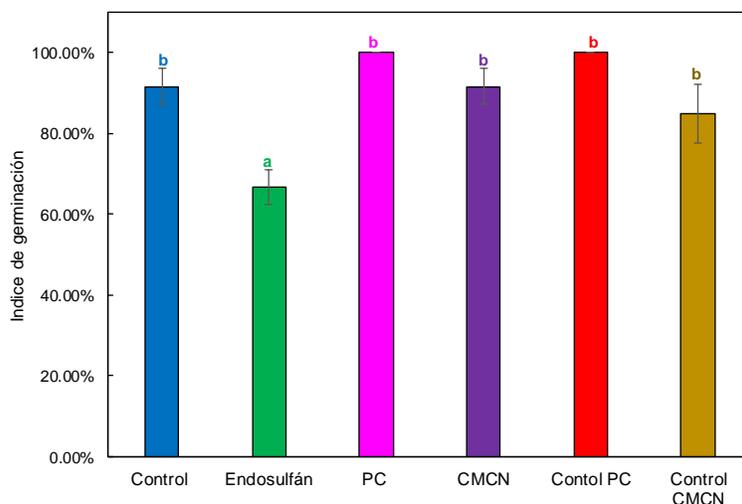
## **8.20 Respuestas a estrés abiótico en material fresco**

Con la finalidad de tener un panorama completo del efecto de los sistemas en material fresco y seco, se germinaron nuevas semillas y se evaluaron los parámetros morfológicos, pigmentos fotosintéticos, osmolitos, marcadores de estrés y antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, encontrándose de manera general un beneficio en la bioaumentación a los suelos tanto control, como a los contaminados con endosulfán.

### **8.20.1 Índice de germinación**

Se germinaron semillas de *P. leptostachyus* durante un mes, bajo diferentes condiciones de cultivo como se describió en la sección 7.18; observándose una menor tasa de germinación en el suelo contaminado con endosulfán (Fig. 8.42). Este comportamiento ya había sido observado en el trabajo previo (sección 8.12.1) y otros autores han mencionado que el índice de germinación es la variable toxicológica más sensible, ya que en esta etapa el desarrollo de la semilla se encuentra más vulnerable a las condiciones medioambientales (Pereira et al., 2010).

Por su parte en los demás sistemas no se encontraron diferencias estadísticas significativas, encontrándose en todos los casos una alta tasa de germinación (entre 80 y 100%).



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos con endosulfán biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

**Fig. 8.42** Índice de germinación de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % de humedad.

### 8.20.2 Evolución de los parámetros de crecimiento en los diferentes cultivos

Los parámetros de crecimiento de las plantas bajo diferentes condiciones de cultivo fueron evaluados cada 3 o 4 días. Los resultados mostraron que, en la mayoría de los días, los vegetales que tuvieron una mayor altura fueron los germinados en el suelo con endosulfán (Fig. 8.43), este comportamiento es opuesto al encontrado en la sección 8.12.1 y probablemente pueda estar relacionado con las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrolló el cultivo, ya que en este caso se tuvo una humedad mayor que la promedio en el invernadero del CINVESTAV, Zacatenco (20% más aproximadamente) y una temperatura ambiental controlada.

Sin embargo, el hecho de que tenga una altura mayor el vegetal desarrollado en el suelo con plaguicida es una situación que había sido reportada en otros grupos de trabajo (Mitton et al., 2014) y asociada a un mecanismo de defensa del vegetal para volatilizar en xenobiótico.

El diámetro de tallo (Fig. 8.44) no varió demasiado a lo largo del tiempo y entre los diferentes sistemas, sin embargo, se aprecia ligeramente menor en los vegetales germinados en el suelo control, pese a ello el desarrollo del cultivo no se vio comprometido.

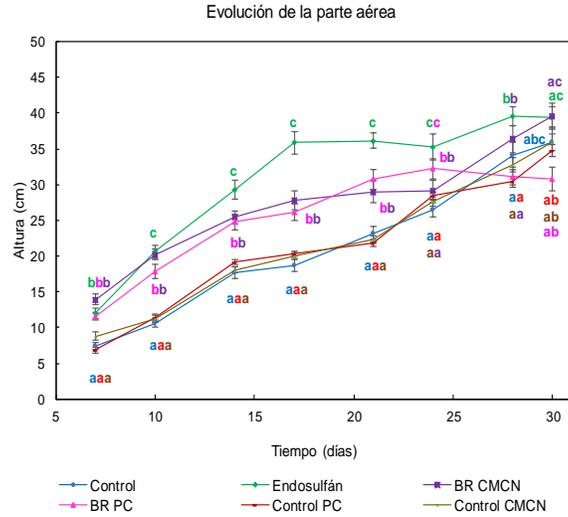
El número de hojas (Fig. 8.45) fue mayor tanto en los sistemas controles bioaumentados, así como en el suelo tratado con el inóculo CMCN y en los cultivos desarrollados en el suelo con plaguicida. La explicación por la que la cantidad de hojas es mayor en el cultivo desarrollado en el suelo contaminado con endosulfán, está nuevamente relacionada con la volatilización del contaminante. Sin embargo, el hecho de que no se aprecien cambios morfológicos no quiere decir que no se tenga algún efecto bioquímico.

Por su parte el que haya un mayor número de hojas en los cultivos que tienen algún tipo de tratamiento biológico, demuestra los beneficios de estos sistemas en el desarrollo del vegetal.

Se tienen varios reportes de que el género *Penicillium* es considerado endófito para diferentes cultivos (Vega et al., 2006; Elsharkawy et al., 2012; Hossain et al., 2007); lo que representa:

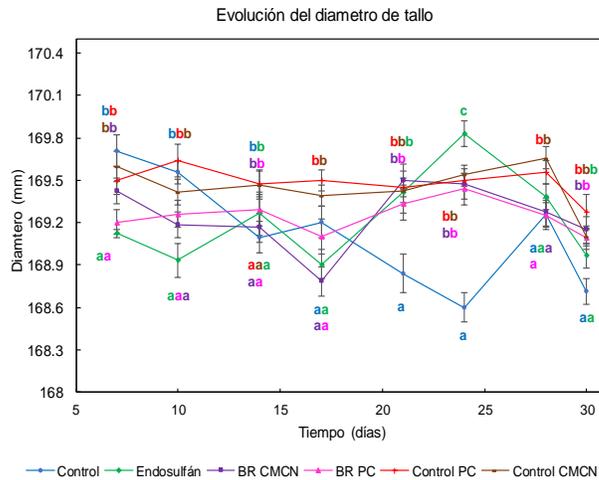
- Un mayor acceso de nutrientes al cultivo.
- Protección a condiciones extremas.
- Protección ante insectos, parásitos y otros microbios.

Esto ocurre por la inducción de diferentes enzimas (quitinasas, glucanasas, peroxidases, oxidasas, liasas, entre otras) y metabolitos secundarios (ácidos salicílicos, jasmonico, etileno, compuestos fenólicos entre otros) de los vegetales, al estar en presencia del hongo (Koike et al., 2001). Dado lo anterior una posible explicación de que exista un mejor desarrollo del cultivo en los sistemas bioaumentados puede ser por la segregación de las fitohormonas previamente mencionadas.



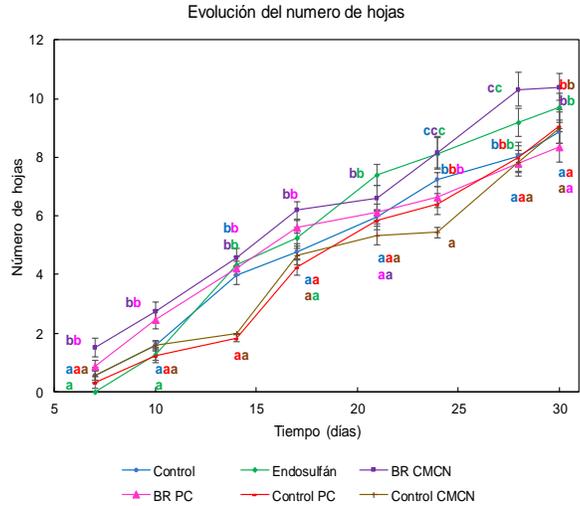
Letras diferentes: Diferencia estadística significativa. Análisis estadístico realizado por tratamiento por día. Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

**Fig. 8.43** Evolución de la parte aérea del cultivo de *P. leptostachyus* desarrollado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa. Análisis estadístico realizado por tratamiento por día. Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

**Fig. 8.44** Evolución del diámetro de tallo del cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

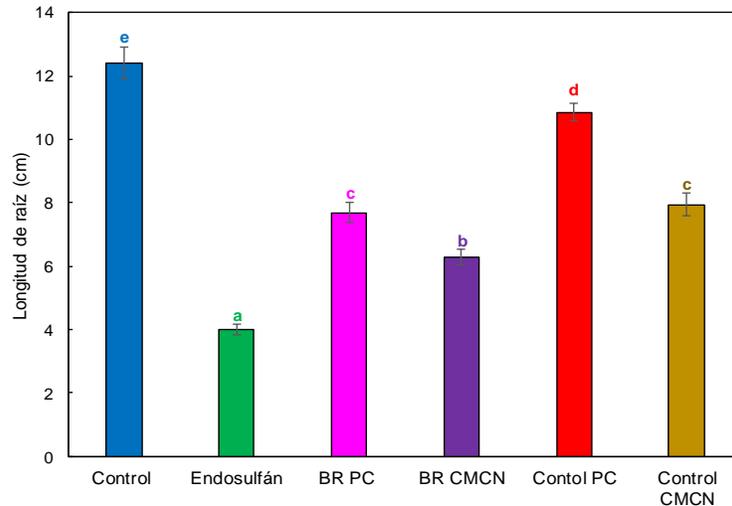


Letras diferentes: Diferencia estadística significativa. Análisis estadístico realizado por tratamiento por día. Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaugmentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaugmentado con inóculo CMCN.

**Fig. 8.45** Evolución del número de hojas del cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

En cuanto al desarrollo de la raíz de la planta, la menor longitud de raíz (Fig. 8.46) fue observada en el cultivo germinado en el suelo con endosulfán, lo cual sugiere que el cultivo se encuentra más estresado y probablemente esto repercute en la producción de osmolitos, antioxidantes y una mayor concentración en los marcadores de estrés oxidativo.

También se observó que los tratamientos con suelo biorremediado, están compensando el efecto del plaguicida, pues el tamaño de la raíz es mayor en ambos tratamientos, pero menor que en los sistemas controles; donde también se apreció que los sistemas bioaugmentados presentaron una longitud menor que el control sin ningún tratamiento. A pesar de lo anterior, el desarrollo de los cultivos no se vio comprometido considerando los demás parámetros de crecimiento evaluados.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

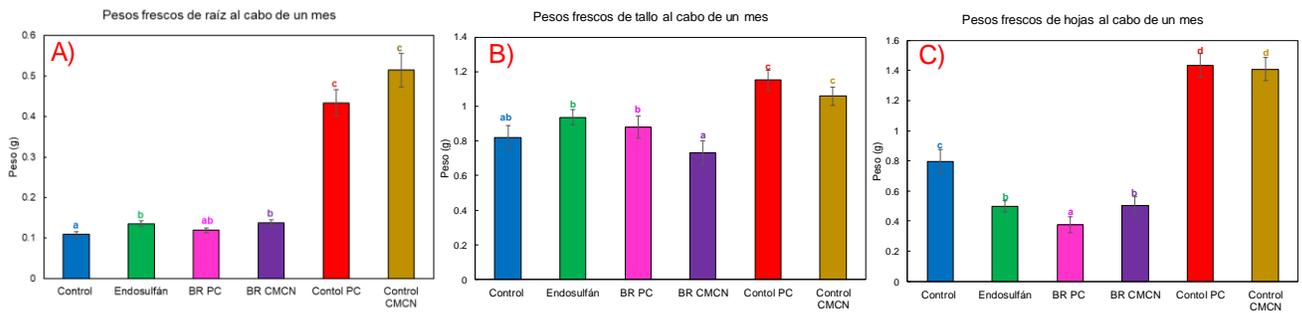
**Fig. 8.46** Longitud de raíz al cabo de 30 días en cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

Los pesos frescos de las diferentes partes de la planta mostraron una mayor diferencia en las hojas (Fig. 8.47 A); encontrándose hasta 3 veces más biomasa en sistemas controles bioaumentados con los inóculos PC y CMCN, este comportamiento puede estar relacionado con un mejor desarrollo del vegetal en estos sistemas; asociado nuevamente a que el inóculo esté actuando como endófito.

Elsharkawy et al., (2012), encontraron el doble de peso fresco y seco en plantas de *Arabidopsis thaliana*; *Nicotiana tabacum* y *N. benthamiana* desarrolladas con la adición de *Penicillium simplicissimum* el cual fue considerado un hongo endófito, explicando este comportamiento a 2 factores; el primero estuvo relacionado con el aumento del contenido de amonio proveniente en la raíz; el segundo se asoció a la habilidad del hongo de proveer minerales a las plantas en una forma más accesible, y finalmente la producción de hormonas como auxinas, citoquininas o giberelinas que alteran la morfología de la raíz y estimulan el crecimiento.

Por su parte contrario a los resultados de la sección 8.17 el menor peso en hojas frescas se encontró en el suelo biorremediado con el inóculo *P. crustosum*. Esto puede estar relacionado con el cambio en las condiciones de crecimiento al cambiar de país (aproximadamente 20% más de humedad); probablemente el exceso de humedad proporcionado con la cámara de germinación favoreció un desarrollo excesivo del hongo provocando una competencia por los nutrientes del suelo con la planta, dejando a ésta una menor cantidad de nutrientes disponibles, repercutiendo en su altura y número de hojas, ya que la biomasa en tallo y raíz no se vio afectada.

En el peso fresco de tallo (Fig. 8.47 B) también se apreció una mayor biomasa en los sistemas controles bioaumentados, aunque la relación no fue tan grande como en las hojas o las raíces donde se mantuvo 3 veces mayor que los demás sistemas (Fig. 8.47 C).



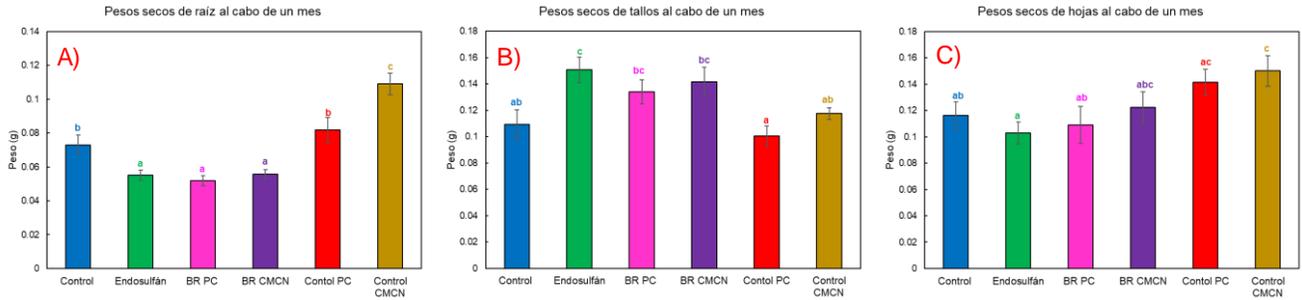
Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

A) Peso de raíz, B) Peso de tallo, C) Peso de hojas.

**Fig. 8.47** Pesos frescos en cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

Los pesos secos (Fig. 8.48) no demuestran diferencias muy marcadas en los mismos; cabe destacar que en el caso de las hojas y las raíces (Fig. 8.48 A y C) se sigue apreciando un peso mayor en los controles bioaumentados, demostrando nuevamente su beneficio en el desarrollo del vegetal.



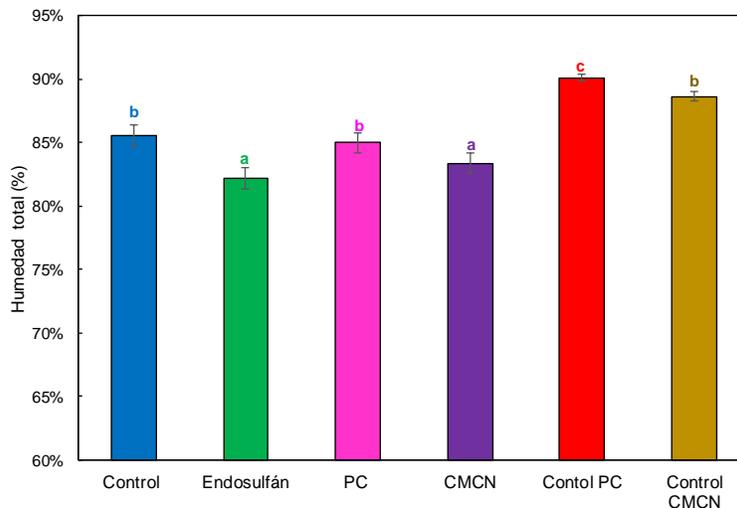
Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

A) Peso de raíz, B) Peso de tallo, C) Peso de hojas.

**Fig. 8.48** Pesos secos en cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

En cuanto a humedad total el control bioaumentado con el inóculo PC presentó el valor mayor, comportamiento asociado a un mejor desarrollo del vegetal (Fig.8.49).



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

**Fig. 8.49** % Humedad total en cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

Los demás sistemas presentaron una humedad similar entre ellos (entre 80 y 90%), sin embargo, se apreció diferencia estadística significativa, siendo el sistema con plaguicida y el tratado con el inóculo CMCN los que presentaron las menores tasas.

### **8.20.3 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos en los diferentes sistemas**

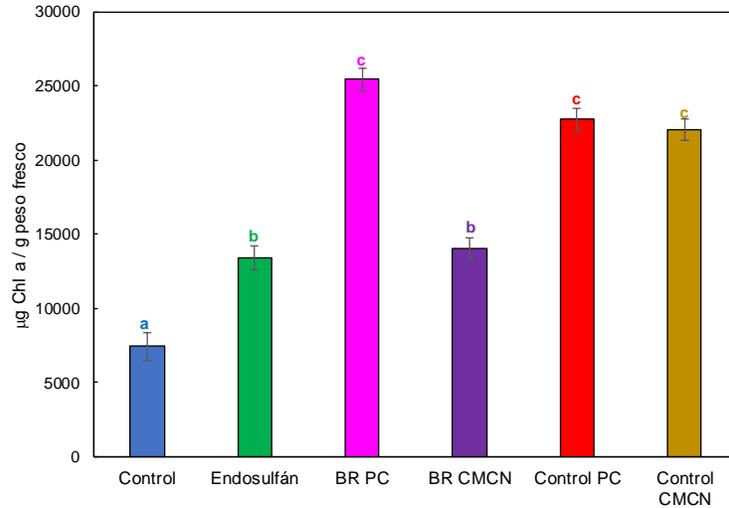
Una vez concluido el tiempo de germinación, se cuantificó el contenido de pigmentos fotosintéticos de los diferentes tratamientos.

Algunos autores atribuyen una disminución en los pigmentos fotosintéticos, cuando el cultivo experimenta condiciones de estrés, lo que se apreció en este estudio, ya que las menores concentraciones; tanto de clorofila  $\alpha$  (Fig. 8.50) como de clorofila  $\beta$  (Fig. 8.51) y carotenoides (Fig. 8.52) fueron observadas en los sistemas control, probablemente por la salinidad del suelo, seguida de los sistemas adicionados con endosulfán solo y con el inóculo CMCN.

La presencia de plaguicida representa un tipo de estrés por lo que puede suponerse que por ello genera menos pigmentos.

Cabe resaltar que en los 3 pigmentos se mantuvo la misma relación en los sistemas, encontrándose la mayor concentración en el sistema biorremediado con el inóculo PC; así como los sistemas controles bioaumentados, demostrando nuevamente en beneficio de la adición de estos microorganismos a los sistemas.

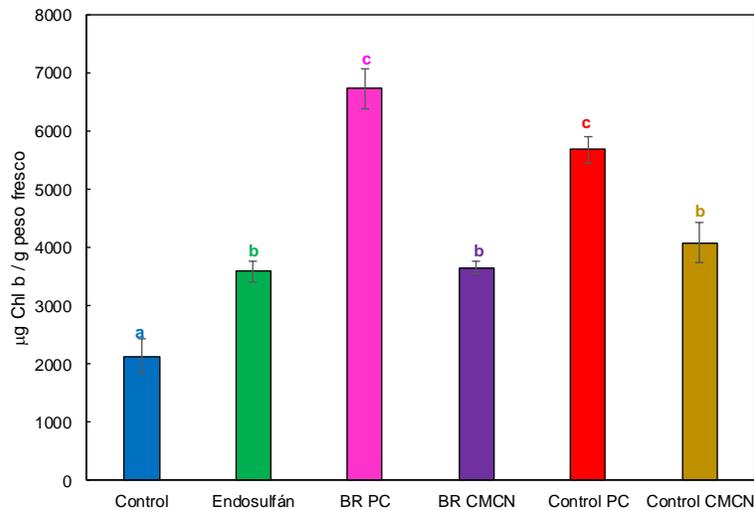
Algunos autores han observado una disminución en los pigmentos fotosintéticos ante salinidad por la competencia iónica existente en las enzimas que llevan a cabo el proceso de la fotosíntesis (Stoeva & Kaymakanova, 2008)



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

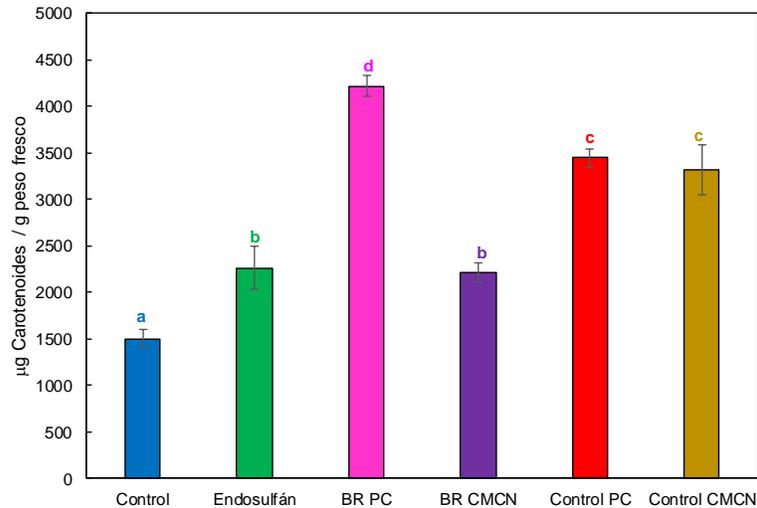
**Fig. 8.50** Cuantificación de clorofila  $\alpha$  en cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

**Fig. 8.51** Cuantificación de clorofila  $\beta$  en cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

**Fig. 8.52** Cuantificación de carotenoides en cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

#### 8.20.4 Evaluación del estrés salino en los diferentes sistemas mediante la evaluación de iones

La cuantificación de iones sodio (Fig 8.53 A) demostró una mayor concentración de este elemento en las raíces y una menor en las hojas, lo que podría interpretarse como un bloqueo del transporte de este elemento a la parte aérea de las plantas como mecanismo de defensa frente a la salinidad.

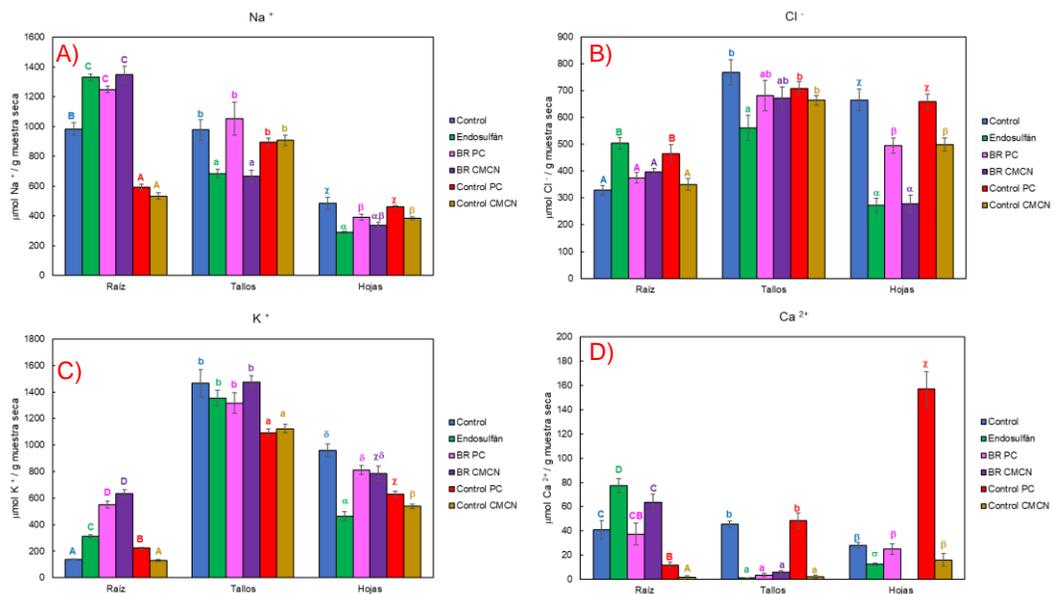
De manera general se aprecia una menor concentración de este ion en los sistemas control bioaumentados, situación que puede relacionarse con la disminución de la conductividad eléctrica de los suelos (más 350  $\mu\text{S}/\text{cm}$  de diferencia).

Igual que en el cultivo seco del CINVESTAV (sección 8.19.1), se apreció que al disminuir la concentración de  $\text{Na}^+$  existe un aumento en la concentración de iones  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Fig. 8.53 B y C); sin embargo, con el tratamiento control PC este comportamiento no fue tan notorio con el  $\text{K}^+$ , lo que indica que en este sistema el cultivo aprovecha los elementos  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$

por igual; mientras que en los otros puede existir la competencia de iones. De manera general, la concentración de  $K^+$  es menor en el sistema con endosulfán, lo que representa un bloqueo de este elemento asociado a la toxicidad del plaguicida.

La concentración de iones  $Ca^{2+}$  en los sistemas fueron; sin embargo, en las hojas del sistema control bioaumentado con el microorganismo *P. crustosum* fue 10 veces mayor. Se sabe que el calcio está relacionado con la transpiración de las plantas y la cantidad de agua que entra al sistema, por lo que no es de sorprenderse que el cultivo con mayor peso en hojas haya sido el sistema control PC, así como el que haya presentado una mayor humedad.

Finalmente, de manera general en el sistema control se encontraron las mayores concentraciones de iones por la salinidad del suelo.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa. Análisis por parte de la planta por tratamiento. Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

A) Cuantificación de  $Na^+$ ; B) Cuantificación de  $Cl^-$ ; C) Cuantificación de  $K^+$ ; D) Cuantificación de  $Ca^{2+}$

**Fig. 8.53** Cuantificación de iones mono y divalentes relacionados con la salinidad en raíces, hojas y tallo de cultivo cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

## **8.20.5 Evaluación de osmolitos en los diferentes sistemas**

Dos de los osmolitos principales en vegetales fueron evaluados (prolina y azúcares), encontrándose en ambos casos la menor concentración en los sistemas controles bioaumentados con el inóculo CMCN (secciones 8.20.5.1 y 8.20.5.2) demostrando el beneficio que tiene la adición de este inóculo en el desarrollo del cultivo de *P. leptostachyus*.

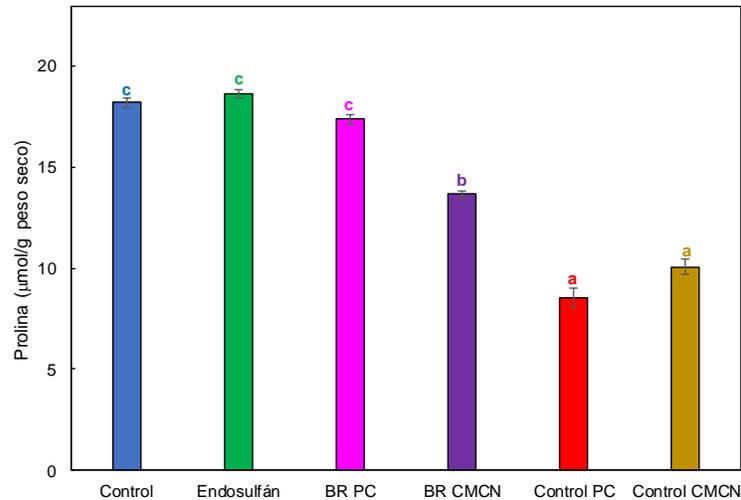
### **8.20.5.1 Cuantificación de prolina**

Como se trató en la sección 8.19.2.1 la prolina en el género *Phaseolus* ha sido catalogada como un osmolito de gran importancia, por lo que es considerado un indicador, ya que aumenta cuando los cultivos se someten a condiciones de estrés.

Contrario a los resultados obtenidos en la sección 8.19.2.1, no se encontró una menor concentración de prolina en los cultivos germinados en el suelo biorremediado con el inóculo PC; si bien la concentración media mayor fue encontrada en el sistema con plaguicida este no presentó diferencia estadística significativa entre el control y el suelo biorremediado con el inóculo PC; sin embargo, el sistema biorremediado con el inóculo CMCN si demostró un 26 % menos producción de este metabolito. En ambos casos las concentraciones fueron mayores que las plantas desarrolladas en el CINVESTAV, probablemente por el cambio en el desarrollo que sufrieron los vegetales al tener una mayor humedad relativa y menor temperatura en la cámara de germinación.

Una alta concentración de prolina en el suelo control es explicada por la salinidad del suelo, y en el suelo con plaguicida por la oxidación que este compuesto puede causar en el cultivo.

Por su parte, los sistemas controles bioaumentados presentaron la menor concentración de este osmolito, siendo 2 veces menor que en los cultivos desarrollados en el suelo salino y el suelo con endosulfán (Fig. 8.54); lo que pudiera estar relacionado con un mejor aprovechamiento de recursos por el vegetal, favoreciendo así su desarrollo.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

**Fig. 8.54** Cuantificación de prolina en cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

### 8.20.5.2 Cuantificación de azúcares

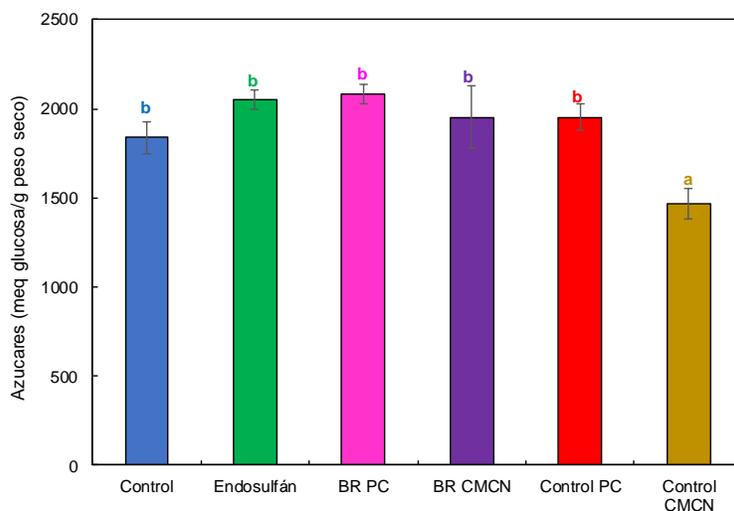
El otro osmolito cuantificado fueron los azúcares, que como ya se discutió en el punto 8.19.2.2 estas aumentan cuando el cultivo es sometido a estrés como una especie de autorregulación del vegetal; lo cual podría explicar porque la concentración de estos es mayor en los suelos con plaguicidas y biorremediados (Fig. 8.55).

Las altas concentraciones de azúcares en los suelos biorremediados se podrían atribuir a la presencia de metabolitos secundarios que quedaron en el suelo, que, si bien no tienen reportes de ser dañinos para el ser humano, para el vegetal pueden estar causando un tipo de estrés.

Al igual que en el caso de la prolina la diferencia en las concentraciones entre los suelos biorremediados con el suelo control no es marcada como la encontrada en los vegetales de la sección 8.19.2.2 probablemente por la diferencia en las condiciones de crecimiento y desarrollo de la planta; además de que en este caso la cuantificación de azúcares se hizo

en cultivo fresco pues con el proceso de secado algunos compuestos se pudieron haber transformado.

Sin embargo, cabe destacar que la bioaumentación en el sistema control por el inóculo CMCN favorece a que exista una menor concentración de este carbohidrato, representando un menor estrés del vegetal en esta condición.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

**Fig. 8.55** Cuantificación de azúcares en cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

#### 8.20.6 Evaluación de marcadores de estrés en los diferentes sistemas

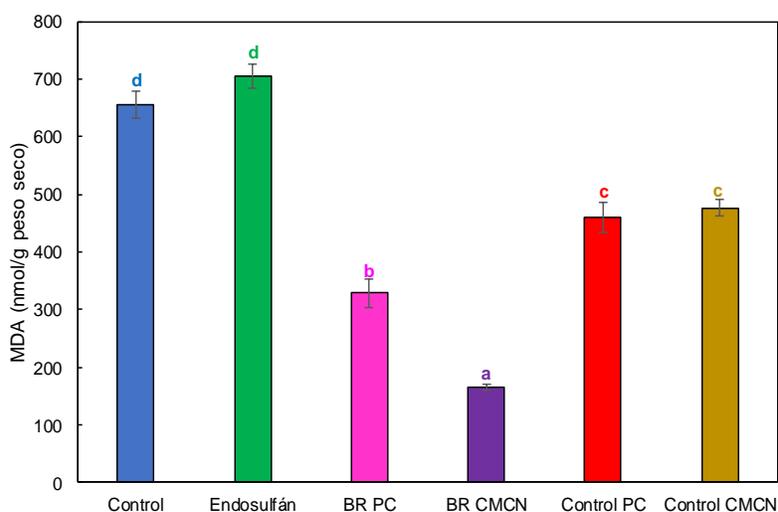
Al igual que en el caso de los osmolitos, 2 marcadores indicativos de estrés fueron evaluados; encontrándose altas concentraciones tanto en el sistema con plaguicida como en el control.

Por su parte el menor estrés oxidativo fue apreciado en el tratamiento de biorremediación con el inóculo CMCN.

### 8.20.6.1 Cuantificación de malondialdehído

Se sabe que el aumento de malondialdehído está relacionado con la muerte celular por la oxidación lipídica en los cultivos, por lo que altos niveles de este aldehído indican un mayor riesgo de muerte vegetal (Taulavori et al., 2001).

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que las plantas germinadas en el suelo con endosulfán presentaron los niveles mayores (4 veces más al compararlo con el sistema BR CMCN, 2 veces con el sistema BR PC y 1,5 con los controles bioaumentados y sistema PC) (Fig.8.56).



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

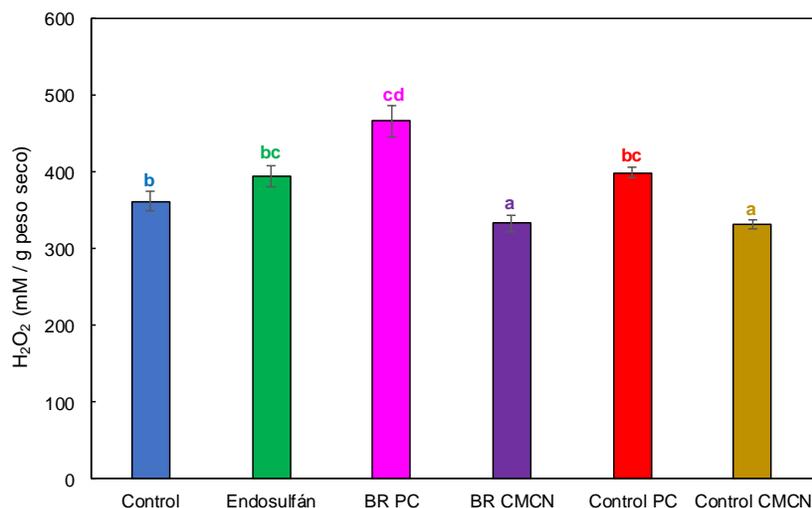
**Fig. 8.56** Cuantificación de MDA en cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

También fue posible apreciar una alta concentración en el sistema control solo, el cual no presentó diferencia estadística significativa con el sistema de plaguicida, probablemente la alta concentración de MDA en este sistema se pueda asociar a la salinidad del suelo.

Finalmente, es importante destacar el efecto benéfico de la adición de microorganismos para que disminuya la oxidación lipídica al tener en el cultivo un menor nivel de estrés oxidativo.

### 8.20.6.2 Cuantificación de peróxido de hidrogeno

La cuantificación de peróxido de hidrogeno en los sistemas mostró una mayor concentración en el cultivo BR PC; seguida por el control PC y el sistema con endosulfán (Fig. 8.57).



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

**Fig. 8.57** Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

El que exista una alta concentración de peróxido en los sistemas con el inóculo PC puede estar relacionado con los radicales •OH y •O<sub>2</sub> que ya han sido reportados para este género de hongos y por el que es utilizado para la oxidación de compuestos xenobióticos como los plaguicidas organoclorados (Izcapa-Treviño et al., 2009).

La presencia de radicales libres en el sistema control podrían estar relacionados con la salinidad del suelo.

La menor concentración observada se presentó en los tratamientos con el inóculo CMCN, por lo que se pudiera suponer que la utilización de este inóculo beneficia a que exista un menor estrés oxidativo para el cultivo.

### **8.20.7 Evaluación de antioxidantes no enzimáticos**

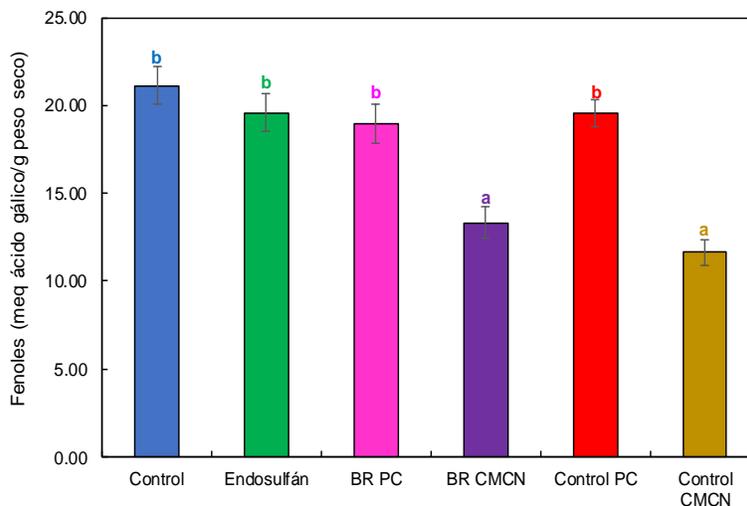
Dos antioxidantes no enzimáticos fueron evaluados con la finalidad de tener una idea de los mecanismos de defensa que activa el vegetal bajo las diferentes condiciones de cultivo; encontrándose al igual que los marcadores de estrés la menor actividad con los sistemas bioaumentados con el inóculo CMCN.

#### **8.20.7.1 Cuantificación de compuestos fenólicos**

Como se discutió en el punto 8.19.3 los compuestos fenólicos se activan como una defensa secundaria de los cultivos cuando se ven expuestos a condiciones que involucran estrés oxidativo.

Al igual que en la cuantificación de  $H_2O_2$  la menor concentración de este antioxidante se apreció en los sistemas bioaumentados con el inóculo CMCN (Fig. 8.58), pues al existir una menor concentración de radicales libres oxidando el vegetal, no se necesita activar esta defensa.

Por su parte los demás sistemas no presentaron diferencia estadística significativa entre ellos; mostrando que la activación de este sistema es similar en todos ellos, comportamiento que se pudiera asociar con los resultados de  $H_2O_2$  obtenidos en la sección 8.20.6.2.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

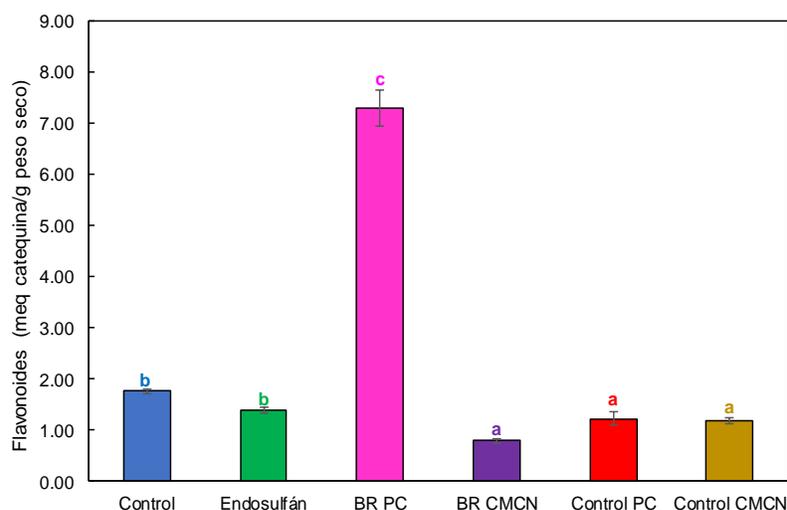
**Fig. 8.58** Cuantificación de compuestos fenólicos en cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 %HR.

### 8.20.7.2 Cuantificación de flavonoides

De manera general la concentración encontrada de flavonoides en los vegetales fue baja (Fig.8.59) y con un valor medio entre los sistemas; salvo el sistema biorremediado con el inóculo PC, valor que fue hasta 7 veces mayor que los demás tratamientos.

Dado que ni el sistema con endosulfán, ni el sistema bioaumentado con el inóculo PC mostraron valores tan altos la única explicación posible es dada por alguna interacción formada entre el inóculo y el plaguicida que haya ocasionado que el vegetal activara esta defensa antioxidante.

Además, cabe resaltar que este es un comportamiento diferente al obtenido en el punto 8.19.3 por lo que debe ser un comportamiento especial que haya surgido en el desarrollo del vegetal bajo las condiciones de cultivo de estos experimentos.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

**Fig. 8.59** Cuantificación de flavonoides en cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

### 8.20.8 Evaluación de antioxidantes enzimáticos

Como se ha discutido anteriormente, cuando un cultivo es sometido a un estrés abiótico como es el caso de la salinidad del suelo sumado a la adición de un plaguicida organoclorado se tienen una gran cantidad de ROS en los sistemas, los cuales dañan el tejido vegetal siendo capaz de llevarlo hasta la muerte (Chaoui et al., 1997) por lo que las plantas activan diferentes antioxidantes tanto no enzimáticos, como los abordados en la sección 8.20.7, y los enzimáticos.

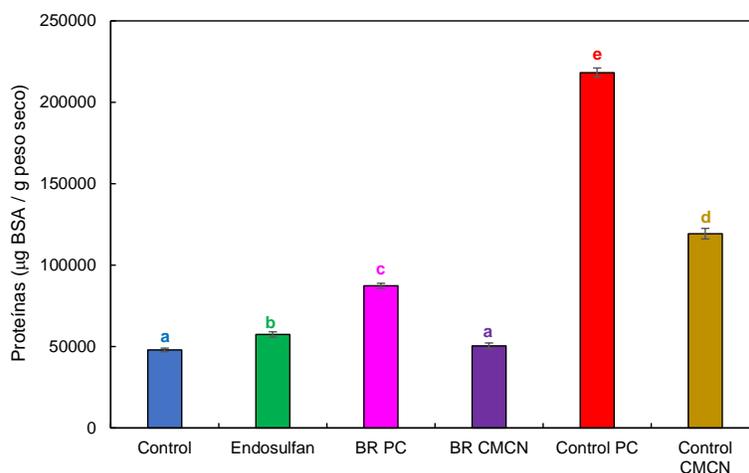
Razón por la que cuatro tipos de enzimas relacionadas con los procesos de oxidación fueron evaluados, encontrándose de manera general que los sistemas control mostraron la mayor activación de estas; por lo que se podría suponer que este tipo de vegetales son más sensibles a la salinidad del suelo que a la adición de xenobióticos.

### 8.20.8.1 Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteínas fue evaluada en los diferentes sistemas; encontrándose la mayor concentración en los sistemas controles bioaumentados (Fig.8.60), lo cual se podía suponer ya que en los parámetros morfológicos fueron los sistemas que mostraron mayor peso.

Es conocido que en condiciones de estrés abiótico se inhibe la síntesis de ciertas proteínas y se promueve otras (Hamid et al., 2010), lo que explicaría que la mayor concentración se encuentre con los sistemas controles bioaumentados pues presentaron un mejor desarrollo.

Contrario a lo esperado, el sistema con endosulfán no presentó la menor concentración esto pudiera ser explicado cómo se mencionó en el párrafo anterior por la promoción de otro tipo de proteínas. Esta hipótesis es reforzada por De Mejia et al., 2003 quienes hablan de un aumento en los niveles de proteínas como un mecanismo de adaptación de los vegetales a condiciones poco favorables para su desarrollo. El hecho de que la menor concentración se haya encontrado en el sistema control, confirma que para el género *Phaseolus* la salinidad juega un rol importante en el estrés oxidativo.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

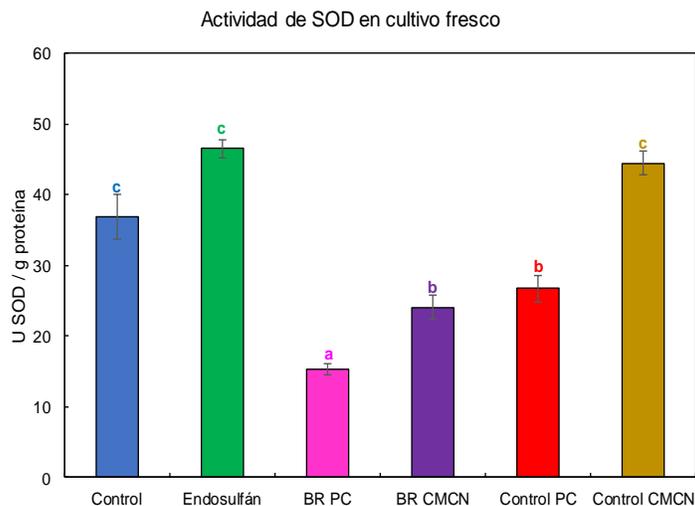
**Fig. 8.60** Cuantificación de proteínas en cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

### 8.20.8.2 Cuantificación de superóxido dismutasa (SOD)

De las enzimas antioxidantes la SOD es de las primeras en activarse cuando el vegetal se encuentra en presencia de radicales libres (Kumar et al., 2017) buscando neutralizar su efecto en el cultivo.

En este caso se apreció que la mayor actividad estuvo presente en los sistemas controles solo y CMCN (Fig. 8.61), así como en el sistema con endosulfán, resultados que se le pueden atribuir tanto a la salinidad como a la oxidación por el plaguicida.

Por otra parte, el que la menor actividad se tenga en el sistema BR PC pudiera explicar que la concentración de antioxidantes bioquímicos sea mayor en este sistema pues probablemente solo se está activando esa barrera.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

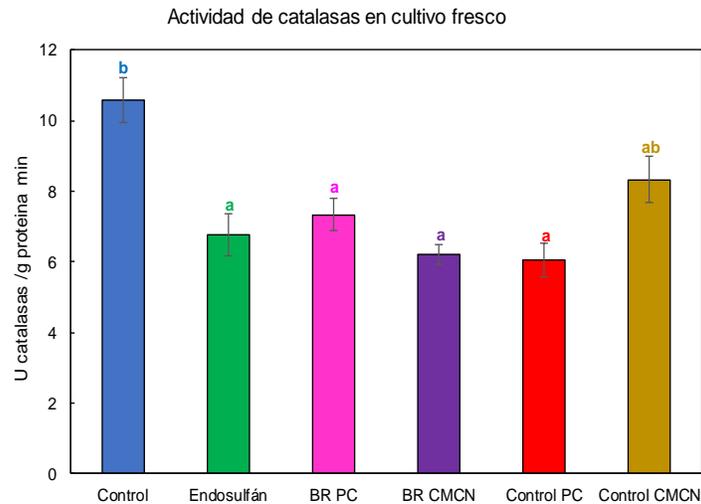
**Fig. 8.61** Actividad del SOD por cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

### 8.20.8.3 Cuantificación de catalasas

Después de la SOD se activan las catalasas las cuales se inducen cuando hay una acumulación de su sustrato ( $H_2O_2$ ); el cual es descompuesto por la enzima para formar oxígeno y agua (Kumar et al., 2017).

En este trabajo se apreció la mayor actividad de esta enzima en el sistema control (Fig. 8.62) lo cual al igual que los parámetros anteriores, podría estar asociado con la salinidad presente del suelo.

Curiosamente igual que el caso anterior también se tuvo una alta actividad de esta enzima con el sistema control CMCN, por lo que podría suponerse que este inóculo está induciendo esta actividad enzimática y se neutraliza con la adición de plaguicida.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

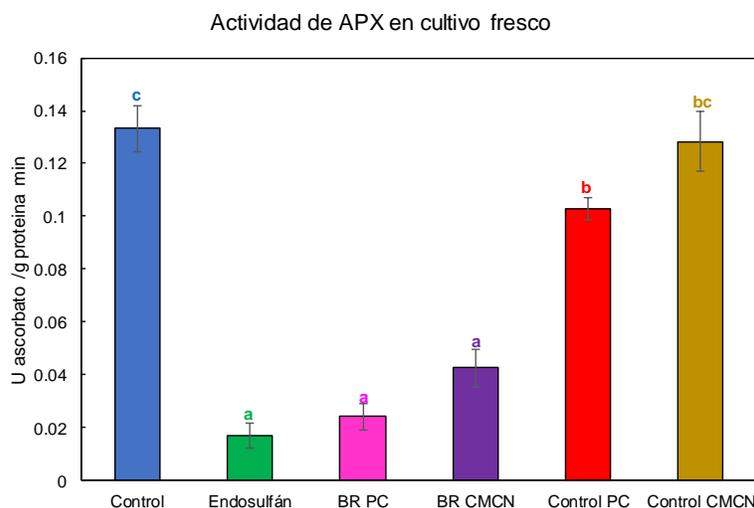
Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

**Fig. 8.62** Actividad del ascorbato peroxidasa por cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

#### 8.20.8.4 Cuantificación de ascorbato peroxidasa

Tanto la glutatión reductasa como la ascorbato peroxidasa tienen un papel importante en el ciclo del glutatión ascorbato el cual es llevado a cabo por las plantas para neutralizar el efecto de los radicales libres formados como consecuencia del estrés oxidativo.

En este caso se apreció que la mayor actividad se encontraba en los sistemas control (Fig. 8.63), por lo que su activación pudiera estar relacionada con la salinidad del suelo y no con la adición de plaguicida.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

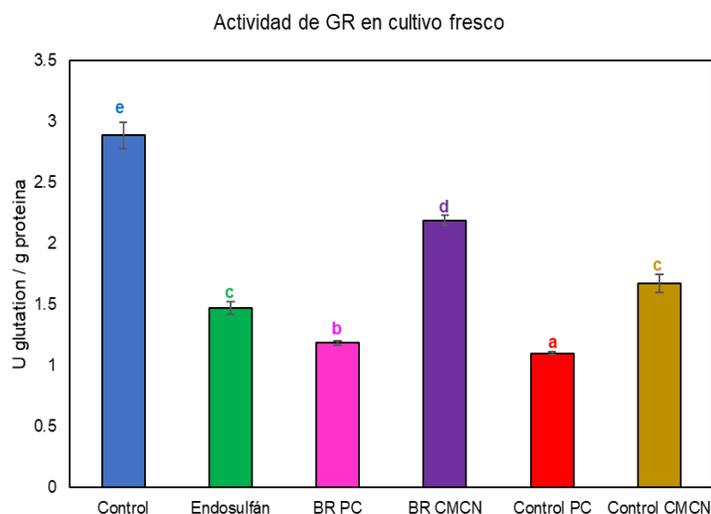
**Fig. 8.63** Actividad del ascorbato peroxidasa por cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

El grupo de trabajo de Chaoui et al., 1997 estudiaron la activación ascorbato peroxidasa en plantas de *Phaseolus vulgaris* sometidas a estrés por cobre, apreciando que en estas la función del ascorbato peroxidasa era proteger el tejido foliar por la detoxificación del peróxido de hidrogeno tóxico; un caso similar se debe estar presentando en este estudio frente al tema de la salinidad.

### 8.20.8.5 Cuantificación de glutatión reductasa

Al igual que en los casos anteriores la mayor actividad de esta enzima se encontró en el sistema control (Fig. 8.64), nuevamente esta conducta se podría atribuir a la salinidad presente en el suelo.

En este caso la menor actividad fue apreciada en los sistemas que tuvieron el microorganismo *P. crustosum*; lo que nos permite concluir que mientras el sistema CMCN activa los antioxidantes no enzimáticos el sistema PC activa los enzimáticos, este es un comportamiento característico de los hongos endófitos.



Letras diferentes: Diferencia estadística significativa.

Control: suelo sin ningún tratamiento; endosulfán: suelo con 1 mg/kg de endosulfán; BR PC y BR CMCN: suelos biorremediados con inóculo *P. crustosum* y CMCN respectivamente; control PC: suelo control bioaumentado con inóculo *P. crustosum*; control CMCN: suelo control bioaumentado con inóculo CMCN.

**Fig. 8.64** Actividad del glutatión reductasa por cultivo de *P. leptostachyus* cultivado en diferentes suelos durante 30 días, en una cámara de germinación a 30 °C y 80 % HR.

## 9. Conclusiones

Las tablas 9.1 y 9.2 muestran la comparación de ambos sistemas tanto en la remediación de suelos contaminados con endosulfán, como en el desarrollo de la planta de *P. leptostachyus* demostrando que cada sistema tiene sus beneficios en ciertos parámetros por lo cual no es posible decidir entre uno u otro para una aplicación a mayor escala.

Existen 2 situaciones a considerar para una aplicación a mayor escala y es que el uso del residuo cítrico es más económico que la producción de pellets de *P. crustosum* sin embargo, se encontró mayor homogeneidad en los resultados con el microorganismo solo a lo que una alternativa a considerar podría ser la inoculación del microorganismo en la cascara de naranja.

**Tabla 9.1** Comparación de sistemas PC y CMCN en biorremediación de suelo salino contaminado con endosulfán.

<b>Parámetro</b>	<b>CMCN</b>	<b><i>P. Crustosum</i></b>
Remoción de endosulfán (%)	85.5 en 2 meses	<b>92.93 en 1 mes</b>
Concentración de sulfato endosulfán después de BR (mg/kg suelo)	<b>0.08</b> <sup>a</sup>	0.199 <sup>b</sup>
Reducción de conductividad (dS/m)	<b>19.29</b> <sup>a</sup>	<b>19.53</b> <sup>a</sup>
Humedad (%)	89.22 ± 0.48 <sup>a</sup>	86.06 ± 0.75 <sup>a</sup>
Carbono orgánico (%)	<b>23.71 ± 0.33</b> <sup>a</sup>	<b>23.38 ± 0.83</b> <sup>a</sup>
Materia orgánica (%)	<b>40.88 ± 0.56</b> <sup>a</sup>	<b>40.31 ± 1.43</b> <sup>a</sup>
Fósforo (mg/kg)	<b>49.78 ± 2.19</b> <sup>b</sup>	41 ± 2.1 <sup>a</sup>
Nitrógeno total (%)	<b>0.45 ± 0.02</b> <sup>b</sup>	0.38 ± 0.02 <sup>a</sup>
Arena (%)	45.72 <sup>b</sup>	<b>37</b> <sup>a</sup>
Arcilla (%)	<b>29.56</b> <sup>a</sup>	31.56 <sup>b</sup>
Limo (%)	24.72 <sup>a</sup>	<b>31.44</b> <sup>b</sup>

**Tabla 9.2** Comparación de los sistemas PC y CMCN en el desarrollo de *P. leptostachyus*

Parámetro	Control PC	Control CMCN	BR PC	BR CMCN
Índice de germinación (%)	<b>100 ± 0<sup>a</sup></b>	85.00 ± 7.25 <sup>a</sup>	<b>100.00 ± 0<sup>a</sup></b>	91.67 ± 4.56 <sup>a</sup>
Altura (cm)	34.79 ± 0.82 <sup>a</sup>	35.94 ± 1.12 <sup>a</sup>	30.8 ± 1.63 <sup>a</sup>	<b>39.52 ± 1.83<sup>a</sup></b>
Numero de hojas	<b>9 ± 1<sup>ab</sup></b>	<b>9 ± 1<sup>ab</sup></b>	8 ± 1 <sup>a</sup>	<b>10 ± 0<sup>b</sup></b>
Peso fresco de hojas (g)	<b>1.43 ± 0.08<sup>c</sup></b>	<b>1.41 ± 0.08<sup>c</sup></b>	0.38 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.06 <sup>b</sup>
Peso fresco de tallo (g)	<b>1.06 ± 0.06<sup>c</sup></b>	<b>1.15 ± 0.05<sup>c</sup></b>	0.88 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.73 ± 0.07 <sup>a</sup>
Peso fresco de raíz (g)	<b>0.43 ± 0.033<sup>b</sup></b>	<b>0.51 ± 0.041<sup>b</sup></b>	0.12 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.008 <sup>a</sup>
Humedad parte aérea (%)	<b>90.07 ± 0.25<sup>c</sup></b>	88.61 ± 0.36 <sup>b</sup>	84.96 ± 0.76 <sup>b</sup>	83.34 ± 0.79 <sup>a</sup>
Longitud de raíz (cm)	<b>10.85 ± 0.27<sup>c</sup></b>	7.94 ± 0.36 <sup>b</sup>	7.68 ± 0.32 <sup>b</sup>	6.28 ± 0.25 <sup>a</sup>
Pigmentos fotosintéticos	31.87 ± 1.07 <sup>a</sup>	29.45 ± 1.33 <sup>a</sup>	<b>36.38 ± 1.23<sup>b</sup></b>	19.90 ± 0.98 <sup>a</sup>
Prolina (μmol / g)	<b>8.53 ± 0.51<sup>a</sup></b>	<b>10.06 ± 0.37<sup>a</sup></b>	17.38 ± 0.23 <sup>c</sup>	13.65 ± 0.18 <sup>b</sup>
Azúcares (meq glucosa /g)	1952.58 ± 72.09 <sup>b</sup>	<b>1464.72 ± 85.02<sup>a</sup></b>	2081.61 ± 56.37 <sup>b</sup>	1953.08 ± 173.32 <sup>b</sup>
MDA (nmol / g peso seco)	460.39 ± 25.12 <sup>c</sup>	476.82 ± 14.49 <sup>c</sup>	328.29 ± 25.91 <sup>b</sup>	<b>165.11 ± 5.46<sup>a</sup></b>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mmol / g)	399.22 ± 6.79 <sup>b</sup>	<b>331.67 ± 6.14<sup>a</sup></b>	467.19 ± 20.85 <sup>b</sup>	<b>333.59 ± 10.27<sup>a</sup></b>
Fenoles totales (meq ácido gálico /g)	19.54 ± 0.76 <sup>b</sup>	<b>11.63 ± 0.70<sup>a</sup></b>	18.96 ± 1.09 <sup>b</sup>	<b>13.31 ± 0.90<sup>a</sup></b>
SOD (u /g proteínas)	26.72 ± 1.90 <sup>b</sup>	44.45 ± 1.63 <sup>c</sup>	<b>15.27 ± 0.77<sup>a</sup></b>	24.09 ± 1.70 <sup>b</sup>
CAT (u /g proteínas)	<b>6.05 ± 0.47<sup>a</sup></b>	<b>8.33 ± 0.67<sup>a</sup></b>	<b>7.34 ± 0.46<sup>a</sup></b>	<b>6.21 ± 0.26<sup>a</sup></b>
GR (u /g proteínas)	<b>1.10 ± 0.01<sup>a</sup></b>	1.67 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.19 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.19 ± 0.04 <sup>d</sup>
APX (u /g proteínas)	0.10 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.13 ± 0.011 <sup>b</sup>	<b>0.02 ± 0.005<sup>a</sup></b>	<b>0.04 ± 0.007<sup>a</sup></b>

## Fase I

El microorganismo *P. crustosum* fue aislado de un residuo cítrico teniendo actividad tensoactiva y emulsificante, ambas propiedades características de los biosurfactantes. Un diseño de experimentos Taguchi L9 fue realizado buscando maximizar dichas propiedades encontrando que la fuente de nitrógeno juega un papel fundamental en la actividad emulsificante, siendo la mejor fuente el  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . La máxima actividad tensoactiva fue encontrada en el sistema con glucosa,  $\text{KNO}_3$ , pH inicial de 5 y agitación de 100 rpm. Buscando favorecer ambas propiedades un sistema compuesto por glucosa,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , pH inicial de 5 y 120 rpm fue seleccionado para los siguientes experimentos teniéndose un producto semi purificado con un  $\Delta\text{TS}$  de 33 mN/m y una  $E_{24}$  de 71.43 %; a este producto se le evaluó su composición encontrando que estaba compuesto por 3.13 % carbohidratos, 76 % lípidos y 20.87 % proteínas por lo que podría ser clasificado como un lipopeptido, lo cual fue comprobado mediante el análisis IR. La estabilidad del producto fue evaluada encontrándose una actividad tensoactiva estable a 80°C, pH de 2 a 12 y salinidad de 20% w/w y actividad emulsificante a 80°C, pH de 8 a 12.

Finalmente, la actividad antimicrobiana del bioproducto fue evaluada ante *E. coli* y *P. putida* encontrándose un 100 % de inhibición usando agar con BS como fuente de carbono / Agar nutritivo: BS (1:1). Adicional a esto el producto se evaluó en un suelo proveniente de la zona chinampera con una concentración inicial de 25,000 UFC de *E. coli* inhibiéndose en un 99.79 % la actividad del microorganismo al 8° día y del 100 % al 12° día.

## Fase II

La caracterización fisicoquímica inicial del suelo mostró un suelo altamente salino, con alto contenido de materia orgánica y arcilla lo que representa una permeabilidad reducida y un favorecimiento en la acumulación de compuestos xenobióticos.

Los procesos de biorremediación de dicho suelo contaminado con endosulfán mostraron la máxima tasa (92.93 % a los 30 días) con el sistema BR PC, sin embargo, este sistema mostro 0.19 mg /kg de sulfato endosulfán residual, por su parte el sistema con el inóculo CMCN tuvo 0.08 mg/kg de sulfato endosulfán con una tasa de remoción del 85.5% al cabo de 2 meses. La adición de BS a los sistemas con inóculos no presentó los resultados esperados, probablemente porque lo inóculos están accediendo al BS como fuente de

carbono en vez del xenobiótico; por otro lado, la adición de biosurfactante al suelo con endosulfán favoreció ligeramente la remoción por los microorganismos nativos alcanzando una tasa del 72.53% al cabo de un mes y mostrando metabolitos de la ruta oxidativa e hidroxidativa. La producción de BS *In situ* demostró que ambos inóculos tenían la capacidad de segregar este metabolito teniendo actividad tensoactiva y emulsificante, sin embargo, estos valores fueron menores que en medio líquido alcanzando un máximo de  $\Delta TS$  de 16.77 mN/m después de la purificación.

La traslocación del plaguicida a las plantas de *Phaseolus leptostachyus* fue evaluada llevando los tratamientos de BR y germinando las semillas simultáneamente; así como biorremediando primero el suelo y después germinados los cultivos, siendo esta última alternativa la más viable, pues en la primera se encontraron concentraciones de endosulfán de hasta 0.3 mg/kg en hojas y 0.2 mg/kg en tallo lo que se vio reflejado en un daño morfológico, por su parte los cultivos que fueron desarrollados en un suelo previamente biorremediado mostró ligera mejoría en el desarrollo del cultivo, este comportamiento es atribuido a una mejora en las propiedades fisicoquímicas del suelo, lo que involucra un mejor aprovechamiento de nutrientes; en ambos sistemas la mayor concentración de plaguicida residual fue encontrado en el tallo.

### **Fase III**

Los parámetros morfológicos de las plantas de *Phaseolus leptostachyus* desarrollados bajo diferentes sistemas, mostraron un menor índice de germinación y longitud de raíz en el suelo con endosulfán, parámetro que puede estar relacionado con la toxicidad de este compuesto para el vegetal; sin embargo, en este sistema también se encontraron el mayor número de hojas y tamaño de parte aérea comportamiento asociado a un mecanismo de defensa del vegetal (volatilización).

Por su parte los sistemas controles bioaumentados mostraron las mejores condiciones de cultivo (tamaño de parte aérea, número de hojas, peso fresco y secos); en estos sistemas se encontraron las mayores concentraciones de clorofila  $\alpha$ ,  $\beta$  y carotenoides junto con el sistema BR PC; los valores más altos de pigmentos fotosintéticos están relacionados con un mejor desarrollo del vegetal. Estos sistemas también presentaron las menores concentraciones de iones probablemente por la segregación de ácidos orgánicos que pueden estar actuando como agentes quelantes o secuestradores de iones. La prolina la

cual es considerada un indicador del género *Phaseolus* demostró 2 veces menos concentración en los sistemas controles bioaumentados, mostrando otro beneficio de la bioaumentación de microorganismos.

Por otro lado, los sistemas que fueron tratados con el inóculo CMCN mostraron las concentraciones de  $H_2O_2$  más bajas, lo que represento menores concentraciones compuestos fenólicos y flavonoides; asociado a esto en el sistema control con el inóculo CMCN se encontró la menor concentración de azúcares y en el sistema BR CMCN la menor concentración de MDA, parámetros también asociados al estrés en los cultivos.

Finalmente, la actividad antioxidante enzimática fue mayor en los sistemas control, probablemente por la salinidad del suelo; y en el sistema control con el inóculo CMCN, concluyendo que el inoculo PC activa los antioxidantes no enzimáticos mientras que el CMCN los enzimáticos.

De manera general no es posible concluir si el sistema PC es mejor que el CMCN o viceversa ya que cada sistema tiene algún beneficio sobre el otro; el sistema PC muestra una mayor tasa de remoción de endosulfán en menor tiempo sin embargo mayor producción de sulfato endosulfán, por otro lado este sistema es más reproducible pues en el inóculo CMCN no se puede garantizar que siempre se tenga la misma relación entre las poblaciones desarrolladas; sin embargo, este sistema es más económico para la aplicación *In situ*.

Ambos sistemas mostraron beneficios en el mejoramiento de calidad de suelo, así como en el desarrollo del cultivo modelo.

## 10. Bibliografía

- Abalos, A., Maximo, F., Manresa, M. A., Bastida, J., (2002), Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10, J. Chem. Technol. Biotechnol., 77(7): 777-784.
- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., Nabi, A., (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. Desalination, 223(1-3), 143-151.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. In Methods in enzymology (Vol. 105, pp. 121-126). Academic Press.
- Ahmed, E. F., Hassan, S. S., (2012), Effect of media composition (carbon and nitrogen sources) on the production of bioemulsifier from *Serratia Marcescens* S10, J. Biotechnol., 6(2): 9-14.
- Al Hassan, M., Morosan, M., López-Gresa, M., Prohens, J., Vicente, O., Boscaiu, M., (2016). Salinity-induced variation in biochemical markers provides insight into the mechanisms of salt tolerance in common (*Phaseolus vulgaris*) and runner (*P. coccineus*) beans. Int. J. Mol. Sci., 17(9), 1582.
- Almamoori, A. M., Saleh, M. M., Salman, J. M., (2018). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soils using augmentation by inoculating with bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*) and fungi (*Penicillium expansum*). Mesopotamia Env. J. 4(3).
- Alvino, A.; D'Andria, R.; Delfine, S.; Lavini, A.; Zanetti, P. (2000). Effect of water and salinity stress on radiation absorption and efficiency in sunflower. Ital. J. Agron. 4, 53–60.
- Amézcuca, V. C., Ferrera, C. R., Esparza, G., F., Ríos, L. E., Rodríguez, V. R., (2004), Effect of combined nutrients on biosurfactants produced by *Pseudomonas putida*. J. Env. Sci. And Health Part A. 39, 2983-2991.
- Amézcuca, V. C., Poggi, V. H. M., F., Esparza, G., F., Ríos, L. E., Rodríguez, V. R., (2007), Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. Bioresource Technol. 98, 237-240.
- Amézcuca-Vega C. (2004). Tesis de doctorado: Producción de biosurfactantes mediante la estimulación de microorganismos. Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV.
- Andrades Rodriguez M., (2012), Prácticas de edafología y climatología, Universidad de la Rioja, Servicio de Publicaciones.

- Anyanwu, Chukwudi, U., (2010), Surface activity of extracellular products of a *Pseudomonas aeruginosa* isolated from petroleum contaminated soil, *Int. J. Environ Sci.*, 1(2): 225-235.
- Aparna, A., Srinikethan, G., Smitha, H. (2012). Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas sp.* 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 23-29.
- Arellano-Aguilar, O., Rendón-Von Osten, J., (2016), La huella de los plaguicidas en México. Green Peace.
- Ashraf, M.; Harris, P.J.C., (2013) Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*, 51, 163–190.
- Audesirk, T., Audesirk, G., Byers, B. E. (2003). *Biología: La vida en la Tierra*. Pearson Education.
- Bachmann, R. T., Johnson, A. C., Edyvean, R. G., (2014), Biotechnology in the petroleum industry: An overview, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 86: 225-237.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., Cameotra, S. S., (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(5), 495-508.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D., (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), 205-207.
- Batista, S. B., Mounteer, A. H., Amorim, F. R., Totola, M. R., (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Tech.*, 97(6), 868-875.
- Bautista, I., Boscaiu, M., Lidón, A., Llinares, J. V., Lull, C., Donat, M. P., Mayoral, O., Vicente, O., (2016). Environmentally induced changes in antioxidant phenolic compounds levels in wild plants. *Acta physiologiae plantarum*, 38(1), 9.
- Beyer Jr, W. F., Fridovich, I., (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161(2), 559-566.
- Bhardwaj, G., Cameotra, S. S., Chopra, H. K., (2013). Biosurfactants from fungi: a review. *J. Pet. Environ. Biotechnol.*, 4(06), 1-6.
- Bidlan, R., Afsar, M., Manonmani, H. K. (2004). Bioremediation of HCH-contaminated soil: elimination of inhibitory effects of the insecticide on radish and green gram seed germination. *Chemosphere*, 56(8), 803-811.
- Blainski, A., Lopes, G. C., De Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852-6865.

- Boscaiu, M., Lull, C., Lidon, A., Bautista, I., Donat, P., Mayoral, O., Vicente, O. (2008). Plant responses to abiotic stress in their natural habitats. Bulletin of university of agricultural sciences and veterinary medicine Cluj-Napoca. Horticulture, 65(1), 53-58.
- Botella-Marrero, M. A., (2017), "Efecto de la salinidad sobre plantas", <http://www.jornadasesamur.com/wp-content/uploads/2017/12/4.4-M%C2%AA-angeles-Botella-SALINIDAD.pdf>
- Bouazizi, H., Jouili, H., Ferjani, E., (2007), Copper-induced oxidative stress in maize shoots (*Zea mays* L.): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and peroxidases modulation. Acta Biologica Hungarica, 58(2), 209-218.
- Bradford, M. M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72(1-2), 248-254.
- Bustamante, M., Duran, N., Diez, M. C. (2012). Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review. J. Soil Science & Plant Nutrition, 12(4), 667-687.
- Calva, G.L., Torres, M. R., (1998), Plaguicidas organoclorados, Contacto S., 30: 35-46.
- Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G. A., Uad, I., González-López, J. (2009). Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. Sci. Total Environ. 407(12), 3634-3640.
- Camargo-de-Morais, M. M., Ramos, S. A. F., Pimentel, M. C. B., de Morais Jr, M. A., Lima Filho, J. L. (2003). Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. World J. Microbiol. & Biotech., 19 (2), 191-194.
- Cardoso F. G., Fonseca A.P.F., Nele M., Zarur C.M.A., (2010), Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*, J. Biomedicine Biotechnol., 1-8.
- Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud (1995), Endosulfán guía para la salud y la seguridad, <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/eco/030513.pdf>
- Chandran, P. R. E. E. T. H. Y., Das, N. I. L. A. N. J. A. N. A., (2010), Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil, Int. J. Eng. Sci. Technol., 2(12), 6942-6953.
- Chang, J. S., Radosevich, M., Jin, Y., Cha, D. K. (2004). Enhancement of phenanthrene solubilization and biodegradation by trehalose lipid biosurfactants. Env. Tox. & Chem., 23(12), 2816-2822.

- Chang, J., Shi, Y., Si, G., Yang, Q., Dong, J., Chen, J. (2020). The bioremediation potentials and mercury (II)-resistant mechanisms of a novel fungus *Penicillium spp.* DC-F11 isolated from contaminated soil. *Journal of hazardous materials*, 396, 122638.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H., El Ferjani, E. (1997). Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, 127(2), 139-147.
- Christofi, N., Ivshina, I. B. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. App. Microbiol.*, 93(6), 915-929.
- Čipinytė, V., Grigiškis, S., Šapokaitė, D., Baškys, E. (2011). Production of biosurfactants by *Arthrobacter sp.* n3, a hydrocarbon degrading bacterium. *Enviroment. Tech. Resources*, 1, 68.
- Colin, V. L., Baigorí, M. D., Pera, L. M. (2010). Bioemulsifier production by *Aspergillus niger* MYA 135: presumptive role of iron and phosphate on emulsifying ability. *World J. Microbiol. & Biotech.*, 26(12), 2291-2295.
- Comisión Federal de la Protección contra Riesgos Sanitarios (2017), Catalogo de plaguicidas, <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>
- Connell, J. P., Mullet, J. E. (1986). Pea chloroplast glutathione reductase: purification and characterization. *Plant Physiology*, 82(2), 351-356.
- De Lima, C. J. B., Ribeiro, E. J., Servulo, E. F. C., Resende, M. M., Cardoso, V. L., (2009), Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* grown in residual soybean oil, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 152(1): 156-168.
- Delsarte, I., Veignie, E., Landkocz, Y., & Rafin, C. (2021). Bioremediation Performance of Two Telluric Saprotrophic Fungi, *Penicillium Brasilianum* and *Fusarium Solani*, in Aged Dioxin-contaminated Soil Microcosms. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 1-14.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Eawag, 2011, [http://eawag-bbd.ethz.ch/end/end\\_map.html](http://eawag-bbd.ethz.ch/end/end_map.html)
- El-Sheshtawy, H. S., Aiad, I., Osman, M. E., Abo-ELnasr, A. A., Kobisy, A. S. (2015). Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil

- recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. *Egyptian J. Petrol.*, 24(2), 155-162.
- Elsharkawy, M. M., Shimizu, M., Takahashi, H., Hyakumachi, M. (2012). Induction of systemic resistance against Cucumber mosaic virus by *Penicillium simplicissimum* GP17-2 in Arabidopsis and tobacco. *Plant Pathology*, 61(5), 964-976.
- FIRA (2019) Panorama agroalimentario. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. Frijol 2019. <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2020/01/Panorama-Agroalimentario-Frijol-2019.pdf>
- Fonseca de Faria, A., Teodoro-Martinez, D. S., Nazareno de Oliveira Barbosa, G., Vaz, B. G., Silva, Í. S., Garcia, J. S., Tótolac, R., Eberlinb, M. N., Grossmand, M., Alves, O. L. Durrant, L. R. (2011). Production and structural characterization of surfactin (C 14/Leu 7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process Biochem.*, 46(10), 1951-1957.
- Food and Agriculture Organizaton <http://www.fao.org/docrep/w1604s/w1604s04.htm>
- Fushiwaki, Y., Urano, K. (2001). Adsorption of pesticides and their biodegraded products on clay minerals and soils. *J. Health Sci.*, 47(4), 429-432.
- Gautam, G., Mishra, V., Verma, P., Pandey, A. K., Negi, S. (2014), A Cost Effective Strategy for Production of Bio-surfactant from Locally Isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and Its Applications. *J Bioprocess Biotech* 2014, 4:6.
- Gaynor, J. D., Volk, V. V. (1976). Surfactant effects on picloram adsorption by soils. *Weed Science*, 24(6), 549-552.
- Ghribi, D., Abdelkefi-Mesrati, L., Mnif, I., Kammoun, R., Ayadi, I., Saadaoui, I., Chaabouni-Ellouze, S. (2012). Investigation of antimicrobial activity and statistical optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant production in solid-state fermentation. *BioMed Research International*, 2012.
- Gil R., Bautista I., Boscaiu M., Lidón A., Wankhade S., Sánchez H., Linares J., Vicente O. (2014) Responses of five Mediterranean halophytes to seasonal changes in environmental conditions, *AoB Plants*. 6: 1–18.
- González de Mejía, E., Martínez-Resendiz, V., Castaño-Tostado, E., Loarca-Piña, G. (2003). Effect of drought on polyamine metabolism, yield, protein content and in vitro protein digestibility in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) bean seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(10), 1022-1030.

- González, M. C., Lull, C., Moya, P., Ayala, I., Primo, J., Primo Yufera, E. (2003). Insecticidal activity of penitrems, including penitrem G, a new member of the family isolated from *Penicillium crustosum*. J. Agric. Food Chem., 51(8), 2156-2160.
- Gonzalez, M., Miglioranza, K. S., de Moreno, J. E. A., Moreno, V. J. (2005). Evaluation of conventionally and organically produced vegetables for high lipophilic organochlorine pesticide (OCP) residues. Food and Chemical Toxicology, 43(2), 261-269.
- Govarthanan, M., Fuzisawa, S., Hosogai, T., Chang, Y. C. (2017). Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons using the filamentous fungus *Penicillium* sp. CHY-2 and characterization of its manganese peroxidase activity. RSC advances, 7(34), 20716-20723.
- Guerra-Santos, L., Käppeli, O., Fiechter, A., (1984), *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source, Appl. Environ. Microb., 48(2): 301-305.
- Guevara Olivar, B. K., Ortega Escobar, H. M., Ríos Gómez, R., Solano, E., Vanegas Rico, J. M. (2015). Morfología y geoquímica de suelos de Xochimilco. Terra Latinoamericana, 33(4), 263-273.
- Grigore, M. N., Boscaiu Neagu, M. T., Vicente Meana, Ó. (2011). Assessment of the relevance of osmolyte biosynthesis for salt tolerance of halophytes under natural conditions. European Journal of Plant Science and Biotechnology, (5), 12-19.
- Hamid, N., Bukhari, N., Jawaid, F. (2010). Physiological responses of *Phaseolus vulgaris* to different lead concentrations. Pak J Bot, 42(1), 239-246.
- Hoai NTT, Shim IS, Kobayashi K and Kenji U (2003) Accumulation of some nitrogen compounds in response to salt stress and their relationships with salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. Plant Growth Regulation 41:159-164.
- Hossain, M. M., Sultana, F., Kubota, M., Koyama, H., Hyakumachi, M. (2007). The plant growth-promoting fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 induces resistance in *Arabidopsis thaliana* by activation of multiple defense signals. Plant and cell physiology, 48(12), 1724-1736
- Hosseini-noosheri, P., Lashgari, H. R., Sepehrnoori, K. (2016). A novel method to model and characterize in-situ bio-surfactant production in microbial enhanced oil recovery. Fuel, 183, 501-511.

- Iannacone, J., Alvariño, L., Caballero, C., Sánchez, J. (2000). Cuatro ensayos ecotoxicológicos para evaluar lindano y clorpirifos. *Gayana (Concepción)*, 64(2), 139-146.
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 2017, "Propiedades de los suelos", [http://www.igac.gov.co/wps/portal/igac/raiz/iniciohome/productos/!ut/p/c5/04\\_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hHT3d\\_JydDRwN3t0BXA0\\_vUKMwf28PI4NAQ6B8JG55T1MCur30o9Jz8pOA9oSdbMat1tElvzziJpC8AQ7gaKDv55Gfm6pfbtRGeyp6wgAh0T8mw!!/dl3/d3/L3dDb0EvUU5RTGtBISEvWUZSdndBISEvNI9BSUdPQkIxQTBHRIFMEILVTJWT0tIMjA2Mw!!/](http://www.igac.gov.co/wps/portal/igac/raiz/iniciohome/productos/!ut/p/c5/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hHT3d_JydDRwN3t0BXA0_vUKMwf28PI4NAQ6B8JG55T1MCur30o9Jz8pOA9oSdbMat1tElvzziJpC8AQ7gaKDv55Gfm6pfbtRGeyp6wgAh0T8mw!!/dl3/d3/L3dDb0EvUU5RTGtBISEvWUZSdndBISEvNI9BSUdPQkIxQTBHRIFMEILVTJWT0tIMjA2Mw!!/)
- Instituto Nacional de Ecología, 2007 <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/372/tecnolog.html>
- Instituto Nacional de Ecología, 2011, "Diagnostico de la situación del endosulfán en México" [http://www.inecc.gob.mx/descargas/sqre/2011\\_diag\\_endosulfan\\_mex.pdf](http://www.inecc.gob.mx/descargas/sqre/2011_diag_endosulfan_mex.pdf)
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2015, "ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DE...DÍA MUNDIAL DEL MEDIO AMBIENTE (05 DE JUNIO)" <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/ambiente0.pdf>
- Ishaq, U., Akram, M. S., Iqbal, Z., Rafiq, M., Akrem, A., Nadeem, M., Shafi, F., Shafiq, Z., Mahmood, S., Baig, M. A. (2015). Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from *Aspergillus flavus*. *J. App. Microbiol.*, 119(4), 1035-1045.
- Izcapa-Treviño, C., Loera, O., Tomasini-Campocoso, A., Esparza-Garcia, F., Salazar-Montoya, J. A., Díaz-Cervantes, M. D., & Rodriguez-Vazquez, R. (2009). Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe) reaction involved in *Penicillium* sp. culture for DDT [1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (p-chlorophenyl) ethane] degradation. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 44(8), 798-804.
- Jean-Louis S., (2002), *Surfactantes tipos y usos*, Venezuela: FiRP.
- Khodja, H., Iddou, A., Aguedal, H., Aziz, A., & Shishkin, A. (2018). Bioremoval of Lead (II) and Cadmium (II) in Single and Multicomponent Systems Using *Penicillium* sp. In *Key Engineering Materials* (Vol. 762, pp. 93-98). Trans Tech Publications Ltd.
- Kitamoto, D., Isoda, H., Nakahara, T. (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants—from energy-saving materials to gene delivery carriers—. *J. Bioscience & Bioengineering*, 94(3), 187-201.
- Koike, N., Hyakumachi, M., Kageyama, K., Tsuyumu, S., Doke, N. (2001). Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-

- promoting fungi: lignification and superoxide generation. *European Journal of Plant Pathology*, 107(5), 523-533.
- Kumar D, Al Hassan M, Naranjo MA, Agrawal V, Boscaiu M, Vicente O (2017) Effects of salinity and drought on growth, ionic relations, compatible solutes and activation of antioxidant systems in oleander (*Nerium oleander* L.). *PLoS ONE* 12(9): e0185017.
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Makarov, S. O., Litvinenko, L. V., Cunningham, C. J., Philp, J. C. (2005). Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Env. Int.*, 31(2), 155-161.
- Leal, S. D. V., Valenzuela, Q. A. I., Gutiérrez, C. M. L., Bermúdez, A. M. C., García, H. J., Grajeda, C. P., Silveira, G. M. I., Meza, M. M. M., Palma, D. A., Leyva, G. G. N., Camerena, G. B. O., Valenzuela, N. C. P., (2014), Residuos plaguicidas organoclorados en suelos agrícolas, *Tierra Latinoamericana*, 32 (1): 1-11.
- Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents.
- Liu, Z. F., Zeng, G. M., Zhong, H., Fu, H. Y., Liu, X. L., (2010), Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* CCTCC AB93108, *J. Central South University of Tech.*, 17(3), 516-521.
- Loreto, F., Velikova, V. (2001). Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology*, 127(4), 1781-1787.
- Luna, J. M., Rufino, R. D., Sarubbo, L. A., Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., De Campos-Takaki, G. M. (2011). Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. *Current microbiology*, 62(5), 1527-1534.
- Luna-Velasco M.A. (2006). Tesis de doctorado: Producción y Propiedades Físicoquímicas del Biosurfactante Sintetizado por *Penicillium sp.* en presencia de fenantreno. *Biología y Bioingeniería*, CINVESTAV.
- Luna-Velasco, M. A., Esparza-García, F., Cañizares-Villanueva, R. O., Rodríguez-Vázquez R., (2007). Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium sp.* *Biochemical Processes. Process Biochemistry*. 42, 310-314.
- Luna-Velazco M.A. (2003). Tesis de licenciatura: Empleo de *Penicillium sp.*, para la remoción de un contaminante polinucleoaromático (fenantreno) presente en suelo y sedimentos. ESIA-IPN.

- Mao, X., Jiang, R., Xiao, W., Yu, J. (2015). Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review. *Journal of hazardous materials*, 285, 419-435.
- Markande, A. R., Acharya, S. R., Nerurkar, A. S. (2013). Physicochemical characterization of a thermostable glycoprotein bioemulsifier from *Solibacillus silvestris* AM1. *Process Biochemistry*, 48(11), 1800-1808.
- Martínez, T. A., Rodríguez, V.R., (2011). Response surface methodology (Box-Behenken) to improve a liquid media formulation to produce biosurfactant and phenanthrene removal by *Pseudomonas putida*. *Ann Microbiol.* 61, 605-613.
- Martinez-Toledo, A., Rios-Leal, E., Vázquez-Duhalt, R., González-Chávez, M. D. C., Esparza-Garcia, J. F., Rodriguez-Vazquez, R. (2006). Role of phenanthrene in rhamnolipid production by *P. putida* in different media. *Environmental technology*, 27(2), 137-142.
- Mata-Sandoval, J. C., Karns, J., Torrents, A. (2000). Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides. *Env. Science & Tech.*, 34(23), 4923-4930.
- Miglioranza, K. S. B., de Moreno, J. A., Moreno, V. J., Osterrieth, M. L., Escalante, A. H. (1999). Fate of organochlorine pesticides in soils and terrestrial biota of “Los Padres” pond watershed, Argentina. *Environmental pollution*, 105(1), 91-99.
- Miller, G. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Anal. Chem*, 31(3), 426-428.
- Mitton, F. M., Miglioranza, K. S., Gonzalez, M., Shimabukuro, V. M., Monserrat, J. M. (2014). Assessment of tolerance and efficiency of crop species in the phytoremediation of DDT polluted soils. *Ecological engineering*, 71, 501-508.
- Mohd-Zawawi R. B. (2005). Tesis de maestria: “Production of biosurfactant by locally isolated bacteria from petrochemical waste”. Universiti Teknologi Malaysia.
- Monteiro, A. S., Coutinho, J. O., Júnior, A. C., Rosa, C. A., Siqueira, E. P., Santos, V. L. (2009). Characterization of new biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA 72 isolated from dairy industry effluents. *J. Basic Microbiol.*, 49(6), 553-563.
- Mora-Chablé O., (2016). Estadía Profesional: “Biorremediación de un Suelo Contaminado por Plaguicidas Organoclorados (POCs) de una Chinampa con un Inóculo Colonizado en Cáscara de Naranja en la Localidad de Cuemanco, Xochimilco, Ciudad de México”. Universidad Tecnológica de Tabasco.
- Morosan, M., Al Hassan, M., Naranjo, M. A., López-Gresa, M. P., Boscaiu, M., Vicente, O. (2017). Comparative analysis of drought responses in *Phaseolus vulgaris* (common

- bean) and *P. coccineus* (runner bean) cultivars. The EuroBiotech Journal, 1(3), 247-252.
- Mukherjee, A. K., Das, K. (2010). Microbial surfactants and their potential applications: an overview. In Biosurfactants (pp. 54-64). Springer New York.
- Munns, R., Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biol., 59, 651-681.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and cell physiology, 22(5), 867-880.
- Naqvi, S. M., Vaishnavi, C. (1993). Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 105(3), 347-361.
- National Center for Biotechnology Information., (2019). COMPOUND SUMMARY: Chlorophyll B. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/chlorophyll-b>
- National Institute of Health, 2015, <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp41-c3.pdf>
- Nayak, A. S., Vijaykumar, M. H., Karegoudar, T. B. (2009). Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas sp.* PNK-04 and its application in bioremediation. International Biodeterioration & Biodegradation, 63(1), 73-79.
- Ndlovu, T., Rautenbach, M., Vosloo, J. A., Khan, S., Khan, W. (2017). Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. AMB Express, 7(1), 108.
- Neto, N. B. M., Custódio, C. C., Gatti, A. B., Priolli, M. R., Cardoso, V. J. M. (2004). Proline: use as an indicator of temperature stress in bean seeds. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 4(3).
- Nrior, R. R., Mene, G. B. (2017). Assessment of bioaugmentation efficiency of *Penicillium Chrysogenum* and *Aspergillus Nidulans* bioremediation of crude oil spill soil. Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology, 11(8), 01-09.
- NOM-021-SEMARNAT-2000. "Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis". Norma Oficial Mexicana. Diario oficial de la federación, 31 de Diciembre de 2002.
- Odukkathil, G., Vasudevan, N. (2013). Enhanced biodegradation of endosulfan and its major metabolite endosulfate by a biosurfactant producing bacterium. J. Env. Science and Health, Part B, 48(6), 462-469.

- Odukkathil, G., Vasudevan, N. (2013). Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(4), 421-444.
- Odukkathil, G., Vasudevan, N. (2016). Residues of endosulfan in surface and subsurface agricultural soil and its bioremediation. *Journal of environmental management*, 165, 72-80.
- Onwosi, C. O., Odibo, F. J. C. (2012). Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 937-942.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S. S., (2011), Environmental applications of biosurfactants: recent advances, *Int. J. Mol. Sc.*, 12(1): 633-654.
- Paranychanakis, N.V.; Chartzoulakis, K.S. Irrigation of Mediterranean crops with saline water: From physiology to management practices. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2005, 106, 171–187.
- Pereira, R. C., Monterroso, C., Macías, F. (2010). Phytotoxicity of hexachlorocyclohexane: Effect on germination and early growth of different plant species. *Chemosphere*, 79(3), 326-333.
- Pornsunthorntawee, O., Wongpanit, P., Chavadej, S., Abe, M., Rujiravanit, R. (2008). Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. *Bioresource Technology*, 99(6), 1589-1595.
- Procuraduria Federal de Protección al Ambiente, (2015), [http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/8233/1/web\\_versionfinal.pdf](http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/8233/1/web_versionfinal.pdf)
- Pruthi V., Cameotra S.S. (1997). Short communication: Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia marcescens*. *World J. Microbiol. and Biotechnol.*, 13: 133-135.
- Reddy, M. S., Naresh, B., Leela, T., Prashanthi, M., Madhusudhan, N. C., Dhanasri, G., Devi, P. (2010). Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. *Bioresource Tech.*, 101(20), 7980-7983.
- Reis, R. S., Da Rocha, S. L. G., Chapeaurouge, D. A., Domont, G. B., Santa Anna, L. M. M., Freire, D. M. G., Perales, J., (2010), Effects of carbon and nitrogen sources on the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1 during rhamnolipid production, *Process Biochemistry*, 45(9): 1504-1510.

- Rikalovic, M. G., Gojic-Cvijovic, G., Vrvic, M. M., & Karadzic, I., (2012), Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain. J. Serb. Chem. Soc., 77(1): 27-42.
- Riojas G. H., Torres B. L., Mondaca F. I., Balderas C. J., Górtares M. G., (2010), Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, Química Viva, 9: 3.
- Rivas, B.; Torrado, A.; Torre, P.; Conterti, A.; Domínguez, J.M., (2008), Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate, J. Agric. Food Chem., 56, 2380–2387
- Rodríguez-Vázquez R. 2010. Reporte. Pruebas de trazabilidad de lodos de perforación base agua y base aceite, empresa VEOLIA-RIMSA.
- Romero Fernández, A. D. J., Arias Mota, R. M., Mendoza-Villarreal, R. (2019). Aislamiento y selección de hongos de suelo solubilizadores de fósforo nativos del estado de Coahuila, México. Acta botánica mexicana, (126).
- Rufino, R. D., Sarubbo, L. A., Campos-Takaki, G. M. (2007). Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. W. J. Microbiol. & Biotech., 23(5), 729-734.
- Sachdev, D. P., Cameotra, S. S. (2013). Biosurfactants in agriculture. Applied microbiology and biotechnology, 97(3), 1005-1016.
- Sánchez, E., López-Lefebvre, L. R., García, P. C., Rivero, R. M., Ruiz, J. M., Romero, L. (2001). Proline metabolism in response to highest nitrogen dosages in green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike). Journal of plant physiology, 158(5), 593-598.
- Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAGARPA), 2012, <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/sanluispotosi/boletines/Paginas/BOL1301112.aspx>
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Clasificaciones más importantes de los plaguicidas <http://tramites.semarnat.gob.mx/Doctos/DGGIMAR/Guia/07-015AD/clasificaciones.pdf>
- Serna-Posso, E. J., (2015), Evaluación de la producción de ácidos orgánicos en microorganismos rizosféricos y sus efectos en la solubilización de fosfatos, Universidad Nacional de Colombia.

- Sharma, S., Singh, P., Raj, M., Chadha, B. S., Saini, H. S. (2009). Aqueous phase partitioning of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers by biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* WH-2. *J. Hazardous Materials*, 171(1), 1178-1182.
- Shaw J. D., (1992), *Introduction to Colloid and Surface Chemistry.*, Ed. Butterworth Heinemann. Fourth Edition. London.pp 64-73.
- Singh, P. B., Sharma, S., Saini, H. S., Chadha, B. S. (2009). Biosurfactant production by *Pseudomonas sp.* and its role in aqueous phase partitioning and biodegradation of chlorpyrifos. *Lett. App. Microbiol.*, 49(3), 378-383.
- Škrbić, B., Predojević, Z. (2008). Levels of organochlorine pesticides in crops and related products from Vojvodina, Serbia: Estimated dietary intake. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 54(4), 628-636.
- Soberón-Chávez G. (2004) Biosynthesis of Rhamnolipids. In: Ramos JL. (eds) *Pseudomonas*. Springer, Boston, MA
- Solís Domínguez F.A. (2007) Tesis doctorado: Acumulación de Cd en *Echinochloa polystachia* asociada a *Glomus moceas* BEG25 y *Pseudomonas fluorescens*. Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV.
- Solís, D.F.A., González, C. M.C., Carrillo, R. G., Rodríguez, V. R., (2007). Accumulation and localization of Cadmium in *Echinochloa polystachya* grown within a hydroponic system. *J. Hazardous Materials*. 141. 630-636.
- Szabados L, Savouré A (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15, 89–97.
- Tahzibi A., Kamal F., Mazaheri A., (2004), Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant, Iran. *Biomed. J.*, 8: 25-31.
- Tao, S., Xu, F. L., Wang, X. J., Liu, W. X., Gong, Z. M., Fang, J. Y., Luo, Y. M. (2005). Organochlorine pesticides in agricultural soil and vegetables from Tianjin, China. *Environmental science & technology*, 39(8), 2494-2499.
- Taulavuori, E., Hellström, E. K., Taulavuori, K., Laine, K. (2001). Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. *Journal of Experimental Botany*, 52(365), 2375-2380.
- Tecon, R., Van der Meer, J. R. (2010). Effect of two types of biosurfactants on phenanthrene availability to the bacterial bioreporter *Burkholderia sartisoli* strain RP037. *App. Microbiol. Biotech.*, 85(4), 1131-1139.

- Thangadurai, P., Suresh, S. (2014). Biodegradation of endosulfan by soil bacterial cultures. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 94, 38-47.
- Timmis, K. N., McGenity, T., Van Der Meer, J. R., De Lorenzo, V. (2010). *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* (p. 4699). Berlin: Springer.
- Torrado, A. M., Cortés, S., Salgado, J. M., Max, B., Rodríguez, N., Bibbins, B. P., Domínguez, J. M. (2011). Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. *Brazilian J. Microbiol.*, 42(1), 394-409.
- Torres-Bustillos, L.G., Bandala-González, E.R., Villatoro-Monzón, W.R., (2012), *Remediación de Suelos y Acuíferos Contaminados en México* (p.208), México: FUNDAp.
- Torres-Cepeda T. E. (2001) Estudio químico y anatómico de dos variedades de frijol (*phaseolus vulgaris* s) cambios postcosecha. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Varadavenkatesan, T., Murty, V. R. (2013). Production of a lipopeptide biosurfactant by a novel *Bacillus sp.* and its applicability to enhanced oil recovery. *ISRN microbiology*, 2013.
- Velázquez- Aradillas J.C. (2010). Efecto del cadmio sobre la producción de biosurfactante por bacterias aisladas del grano de café. *Biología y Bioingeniería*, CINVESTAV.
- Velázquez, A. J. C., Jiménez, T. J., González, C. M. C., Bautista, Z. F., Rodríguez, V. R., (2011). Characterization of an emulsifier produced by a *Bacillus cereus* strain tolerant to cadmium and isolated from green coffee grain. *World J. Microbiol. & Biotech.*, 27 (4), 907-913.
- Vega, F. E., Posada, F., Peterson, S. W., Gianfagna, T. J., Chaves, F. (2006). *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. *Mycologia*, 98(1), 31-42.
- Vicente-Murillo, R., Marrero-Delange, D., González-Canavaciolo, V. L., Tamame-Tirado, D., Gutiérrez-Amaro, J. (2014). Contenido de ácidos grasos de las partes aéreas de *Portulaca oleracea* L. que crecen en Cuba. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 45.
- Vipulanandan, C., Ren, X. (2000). Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. *J. Env. Eng.*, 126(7), 629-634.
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343-371.

- Wadekar, S., Kale, S., Lali, A., Bhowmick, D., Pratap, A. (2012). Sophorolipid production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214) from virgin and waste frying oils, and the effects of activated earth treatment of the waste oils. *J. of the American Oil Chemists' Society*, 89(6), 1029-1039.
- Wattanaphon, H. T., Kerdsin, A., Thammacharoen, C., Sangvanich, P., Vangnai, A. S. (2008). A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization. *J. App. Microbiol.*, 105(2), 416-423.
- Weimberg, R. (1987). Solute adjustments in leaves of two species of wheat at two different stages of growth in response to salinity. *Physiologia Plantarum*, 70(3), 381-388.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., Taylor, J. L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Wong, F., Alegria, H. A., Bidleman, T. F. (2010). Organochlorine pesticides in soils of Mexico and the potential for soil–air exchange. *Env. Pol.*, 158(3), 749-755.
- Wong, J. W., Fang, M., Zhao, Z., Xing, B. (2004). Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions. *J. Env. Qual.*, 33(6), 2015-2025.
- Wu, J. Y., Yeh, K. L., Lu, W. B., Lin, C. L., Chang, J. S. (2008). Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresource Tech.*, 99(5), 1157-1164.
- Xia W.J., Luo Z.B., Dong H.P., Yu L., (2013), Studies of biosurfactant for Microbial Enhanced Oil Recovery by using bacteria isolated from the formation water of petroleum reservoir, *Pet. Sci. Tech.*, 31: 2311-2317.
- Yin, Z., Guo, W., Xiao, H., Liang, J., Hao, X., Dong, N., Yin, F. (2018). Nitrogen, phosphorus, and potassium fertilization to achieve expected yield and improve yield components of mung bean. *PloS one*, 13(10), e0206285.
- Youssef H.N., Simpson D.R., Duncan K.E., McInerney M.J., Folmsbee M., Fincher T., Knapp R.M., (2007), In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(4):1239–1247.
- Yuan, H., Yang, J., Chen, W. (2006). Production of alkaline materials, surfactants and enzymes by *Penicillium decumbens* strain P6 in association with lignite degradation/solubilization. *Fuel*, 85(10), 1378-1382.

- Zengin, F. K., Munzuroglu, O. (2005). Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47(2), 157-164.
- Zhang, C., Wang, S., Yan, Y. (2011). Isomerization and biodegradation of beta-cypermethrin by *Pseudomonas aeruginosa* CH7 with biosurfactant production. *Bioresource Tech.*, 102(14), 7139-7146.
- Zhang, Y. I. M. I. N., Miller, R. M. (1992). Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *App. Env. Microbiol.*, 58(10), 3276-3282.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64(4), 555-559.
- Zúñiga Escobar, O., Osorio Saravia, J. C., Cuero Guependo, R., Peña Ospina, J. A. (2011). Evaluación de tecnologías para la recuperación de suelos degradados por salinidad. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 64(1).

## 11. Perspectivas a futuro

- Evaluar si los demás microorganismos del consorcio microbiano tienen capacidad de producir biosurfactante y biotransformar plaguicidas organoclorados.
- Evaluar a fondo la actividad antimicrobiana del biosurfactante producido ante *E. coli* y otros microorganismos patógenos de interés.
- Evaluar el desarrollo y aplicación en suelos salinos y contaminados de *P. crustosum* teniendo como única fuente de nutrientes la cascara de naranja.
- Evaluar a fondo la capacidad endófitra de *P. crustosum*.
- Evaluar la utilización de los diferentes hongos del consorcio microbiano, de manera conjunta y aislada como biofertilizantes en diferentes cultivos.

## Anexo I

1° artículo

Enviado y aceptado en Preparative Biochemistry and Biotechnology

### **Bioremediation of an agricultural saline soil contaminated with endosulfan and *Escherichia coli* by an active surface agent induced in a *Penicillium crustosum* culture**

This study evaluates the production of a biological active surface agent (BASA) through its surface tension (ST) and emulsifying activity ( $E_{24}$ ) for endosulfan degradation (ED) and *Escherichia coli* growth inhibition (*EcGI*) in an agricultural saline soil. The fungus, identified as *Penicillium crustosum* was isolated from the *Citrus sinensis* peel (CsP), then the surface properties were evaluated in 9 culture media through a Taguchi L9 experimental design. The culture conditions included: stirring speed, pH, carbon (C) and nitrogen (N) sources; being glucose,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 120 rpm and pH of 5, the most significant parameters in the BASA production. The BASA identified as a lipopeptide type, showed a  $\text{ST}=38 \text{ mN m}^{-1}$  and  $E_{24}=71\%$ . Both properties were stable at  $80^\circ\text{C}$ , while ST presented stability in the pH range of 2–12, and a saline concentration of  $200 \text{ g L}^{-1}$ ;  $E_{24}$  was also stable at a pH between 8–12. Further application of BASA and fungal inoculum to a contaminated agricultural saline soil presented an *EcGI* of 99.8% on the 8<sup>th</sup> day, and ED of  $92.9 \pm 4.7\%$  in 30 days, respectively; being the first report that uses this fungus for pesticide and bacteria elimination from an agricultural saline soil.

**Keywords:** Active surface properties; bioremediation; endosulfan; *Escherichia coli*; *Penicillium crustosum*.

#### **Introduction**

In Mexico, there is an ancient traditional agricultural technique narrow raised platforms surrounded by canals known as “chinampas” that are localized in the Xochimilco zone; this place is recognized as a Ramsar site, a World Heritage site by UNESCO, and a Globally Important Agricultural Heritage System by the Food and Agriculture Organization (FAO).

However, the land use has changed from traditional agriculture to recreational place, situation than involved a water pollution, and the channel is filled by water from a wastewater treatment plants [1]; causing contamination with pathogenic microorganisms (*Escherichia coli*, *Salmonella*, Fecal coliforms, among others), which are the main microorganisms causing gastrointestinal diseases. Other organic contaminants in the wastewater are agrochemicals, such as organochlorine pesticides (OCPs) that include endosulfan, hormones, and plasticizers, and inorganic contaminants, such as heavy metal (Pb, Zn, Cr, and Cu) [2].

Endosulfan has been restricted in several countries but is still used in Mexico. Since it is cumulative [3] and has poor solubility in water ( $0.33 \text{ mg L}^{-1}$ ), it is more persistent and recalcitrant than other OCPs [4]. In the soil, the half-life of endosulfan under aerobic condition can be up to 6 years [5], and it is not easily degraded (recalcitrant) since it has been found in different environments, such as in the Arctic in air, rain, snow, and ice, and in waterways of rivers and lakes [6]. In Africa, it is frequently used in Benin, Ethiopia, Ghana, and Senegal, as well as in the Winam Gulf, which is one of the most OCP contaminated lakes. In South Asian countries, India is one of the biggest endosulfan consumers, where many mishandling accidents have occurred [7]. In South America, endosulfan is one of the most widely acquired pesticides due to the lack of legislation, and it has been found in water bodies in Argentina, Paraguay, and Brazil. In North America, the U.S. still manufactures and applies it to soils, where it has been detected [8]. Notably, in Europe, ten years after the signing the Stockholm agreement, where the use of endosulfan was prohibited, traces of endosulfan and its metabolite, endosulfan sulfate, were found in Western European soils [9]. Additionally, endosulfan can translocate into crops, having access to living organisms, including humans [10], where they cause endocrine disruption, effects on the nervous and reproductive systems, shortness of breath, decreased respiration, convulsion physical deformities, mental disorders, abortions, cancer, and delayed sexual maturity [5]. Given the toxicity and persistence of this compound, several biodegradation assays with different microorganisms have been carried out for its removal from soil (Table 1).

Since endosulfan is a hydrophobic compound, it is not easily available for biodegradation; therefore, chemical surfactants have been used to enhance its solubility [11] and availability for microbial degradation, even though, they produce more toxic compounds. For this reason, an alternative for these types of surfactants could be the use of surfactants produced by microorganisms, known as BASA [12].

Bacteria and yeasts are reported as the most frequently BASA producers [13, 14]. However, there are few reports about BASA production by fungi, mainly with the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Trichosporon* [15-18].

BASA comprises a lipid-soluble (non-polar) and water-soluble (polar) segment that allows the reduction of surface and interfacial tension between individual molecules [12] and emulsification of the hydrophobic and hydrophilic phases.

The ST and E<sub>24</sub> produced by microorganisms depend on the type and concentration of C and N sources [17], as well as environmental conditions [19], which affect their metabolic pathway. Among the C sources, glucose, sucrose, and molasses are miscible in water, and oils, hydrocarbons, and fatty acids those immiscible in water. Peptone and urea are organic N sources that enhance microbial growth, and inorganic compounds, such as NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, are also used due to N limitation [20].

*Citrus sinensis* peel (CsP) could be a potential nutrient source, considering their relative availability and its high nutrient composition (44.4% C and 0.9% N) [21]. This waste represents up to 40% of the total fruit and comes from the most used citrus fruit worldwide [22]. Conversely, different species of *Penicillium* grow in this type of waste [23], being *P. crustosum* one of the no pathogens for humans [24].

The purpose of the present research is to produce a BASA under several culture conditions of *P. crustosum* isolated from a *Citrus sinensis* peel and its effect on *E. coli* inhibition and endosulfan degradation in an agricultural saline soil.

## **Materials and methods**

***Isolation and identification of the fungus:*** The microorganism used in this study were obtained from the *Citrus sinensis* peel and identified based on the frequency of the 16S-ITS1-

5.8S-ITS2-26S ribosomal segment, amplifying the oligonucleotides ITS4 and ITS5 to obtain two sequences.

To obtain the ribosomal segments, the microorganism were grown on potato dextrose agar (PDA) at 28°C for 48 h; subsequently, 500 mg of biomass were sampled for DNA extraction using a ZR Fungal/Bacteria DNA MiniPrep kit. A 1% agarose gel was run for 15 min at 100 V to check the expected fragment size (500–800 nt). The obtained sequences were edited in the Chromas 2.4 program and compared to the BLAST nucleotide in the National Center for Biotechnological Information (NCBI). Sequences were aligned to those obtained in the BLAST search with the Clustal W program to construct a dendrogram by the neighbor-joining method.

***Fungal inoculum preparation:*** The isolated microorganisms were grown on PDA agar at 30°C for 5 days. Then, 6 mm diameter agar disks were added to a 500-mL Erlenmeyer flask with 200 mL of modified Wunder medium [17]. Modified Wunder media was composed of ( $\text{g L}^{-1}$ ): glucose (10),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.5),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.875),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.125),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.1), NaCl (0.1),  $\text{MnCl}_2$  (0.05),  $\text{FeSO}_4$  (0.001), and peptone (2).

The fungus was incubated at 120 rpm and 30°C for 3 days to prepare the inoculum, and then the biomass was filtered through 540 Whatman filter paper. The biomass humidity was determined, and one g of dry weight of biomass per liter was used as inoculum for nine cultures established in the Taguchi L9 experimental design.

All chemicals were ACS grade and purchased from Sigma–Aldrich (México).

***Production of BASA:*** BASA production was performed through a Taguchi L9 experimental design, with C and N sources, pH, and agitation speed as the independent variables; and ST and  $E_{24}$  as response variables (Table 2).

***Culture conditions of the Taguchi L9 experimental design:*** The mineral medium had the following composition ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.5),  $\text{MnSO}_4$  (0.03),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.875),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.125),  $\text{CaCl}_2$  (0.1), NaCl (0.1), and  $\text{FeSO}_4$  (0.01). All chemicals were ACS grade and purchased from Sigma–Aldrich (México). The C and N sources were added according to the different conditions established in the Taguchi L9 arrangement at a C/N ratio of 20 °C

was determined in a TORCH Combustion Total Organic Carbon (TOC) machine. The C sources evaluated were soybean oil, glucose, and CsP. The N sources employed were peptone, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, and NaNO<sub>3</sub>. Fungi were incubated in a 125-mL Erlenmeyer flask, containing 50 mL of each culture composition, and the pH was adjusted previously with 10% tartaric acid solution. One g of fungal inoculum was added, and the flasks were incubated at 30°C and 100, 120, or 150 rpm.

*Surface properties evaluation of the fungal extract:* Samples of Taguchi L9 experimental design were collected every 2 days and filtered through a 540 Whatman filter paper.

Surface properties were determined in the fungal broth extract. Surface tension was evaluated with a Krüss tensiometer (model K6), and the emulsifying activity at 24 h was evaluated with diesel according to Pruthi and Cameotra [25].

*Statistical analysis of Taguchi L9:* An analysis of variance (ANOVA) was done at the experimental data. Each experiment was carried out in triplicate. A comparison of means was employed with a least significant difference (LSD) method ( $\alpha=0.05$ ), in which different letters have significant statistical difference. Results are reported as the mean  $\pm$  the standard deviation.

***Fungal extract purification:*** Once the Taguchi L9 shows the better culture condition, the microorganism was growth on the selected mineral medium (glucose, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, pH=5, 120 rpm) and the crude extract was purified by a modified method [26].

The extract was acidified with HCl 6 M until the pH decreased to 2, and it was left for 18 h at 4°C for stabilization. Afterwards, an equal amount of 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> was added to the extract, followed by extraction with a chloroform:ethanol solution (2:1). All solvents were ACS grade and purchased from JT Baker. The aqueous phase of the fungal extract was placed in a roto evaporator at 60°C to eliminate the solvent, and the resulting liquid was used to evaluate the stability of the surface properties.

***Characterization of BASA:*** The chemical composition of BASA was determined through carbohydrate content [27], lipids [25], and protein fraction [28]. The functional groups were

determined in a Nicolet Fourier transform infrared spectrometer (FTIR) with ATR and accessories for solids and a reading range from 650 to 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Samples were prepared in spectrophotometric dispersion equipment with KBr quality [29].

***Evaluation of BASA stability under different conditions:*** BASA stability was evaluated at different pHs, temperatures, and salt concentrations. pH was adjusted in the range of 2 to 7 with HCl 1 M and from 8 to 12, with NaOH 1M. Temperature stability was set at 40, 60, 80, or 100°C for 18 h, and salinity at 0–200  $\text{g L}^{-1}$  concentrations of NaCl. Each experiment was carried out in triplicate. Results are reported as the mean  $\pm$  the standard deviation.

***Biodegradation of endosulfan and inhibition of E. coli in salty agricultural soil:*** A saline soil from the agricultural zone of Mexico City with a N 19° 16' 24.9", W 99° 05' 29.9" geolocation was employed for *E. coli* and endosulfan removal.

*Characterization of soil:* Conductivity, pH, carbon content, organic matter, nitrogen, phosphorus, and texture of soil were analyzed according to the Mexican norm NOM-021.

Initial *E. coli* was determined in the soil, therefore, 1 g of soil and 9 ml of 0.85 % saline solution were added in a 15 mL test tube, further, the solution was shaken in a vortex for 1 minute. Then 1mL of the previous solution was added to 9 mL of the saline solution in another test tube, this procedure was performed several times for the colonies unit counting, in EMB agar medium (Merck ®).

*E. coli inhibition:* Experiments were performed in 125 mL serologic bottles with 10 g of soil and 10 mL of BASA. Cultures were incubated at 30°C and aerated daily for 5 min at a flow rate of 130  $\text{mL min}^{-1}$  over 14 days. A control experiment without BASA was set for each experiment. Then, three bottles were sampled every 2 days and diluted with 0.85% saline solutions for microbial colony counting, where growth was performed in EMB agar medium (Merck ®) for *E. coli* determination.

*Biodegradation systems for endosulfan degradation:* The endosulfan degradation experiments were done in 125 mL serologic bottles containing 10 g of soil with one  $\text{mg kg}^{-1}$

of endosulfan, and further incubated at environmental conditions to maintain system humidity at 80% with a daily aeration of 130 mL min<sup>-1</sup> for 5 min for 2 months.

The endosulfan used in this study was a commercial granulated endosulfan (GOWAN, Mexico) that was diluted in hexane to obtain a concentration of 10 mg L<sup>-1</sup> stock solution, which was further added to the soil to have a concentration of one mg kg<sup>-1</sup>. Once the solution was added to the soil it was stirred vigorously for 18 h to obtain a homogeneous distribution of the endosulfan for its further determination in a gas chromatography.

*P. crustosum* inoculum was grown under the best conditions resulting from the Taguchi L9 experimental design, as previously described.

Three samples were taken at the initial time, 7, 14, and 30 days, for analyses of  $\alpha$  and  $\beta$  endosulfan. Results are reported as the mean  $\pm$  the standard deviation.

The four systems for endosulfan biodegradation were:

- Fungal bioremediated (FBR) system: soil with 1% (w w<sup>-1</sup>) *P. crustosum* inoculum.
- FBR-BASA: soil amended with 1% (w w<sup>-1</sup>) *P. crustosum* inoculum and 10 mL BASA.
- BASA-E: soil amended with BASA in a relation 1:1.
- Control: soil with native microorganisms.

*Endosulfan quantification:* Endosulfan extraction from the soil was performed by the EPA 3546 method [30] in a CEM MARS-Xpress microwave, and cleaning of the extracts was done in a Florisil adsorption column (Supelclean™ ENVI™ Florisil® SPE Tubes 6 mL, 1 g, Sigma-Aldrich, Mexico).

Quantification was done in a Varian Gas Chromatograph (GC) (Model CP-3380) with a power source of <sup>63</sup>Ni, a Varian capillary column (15 m long, 0.25 mm internal diameter, 0.25 mm cap thickness and CP-Sil 5CB), and N as a carrier gas at 1 mL min<sup>-1</sup> of flow rate. GC conditions had an injection temperature of 200°C and detector temperature of 300°C. The oven temperature was programmed as follows: an increase from 100 to 176°C at 4°C min<sup>-1</sup>, from 176 to 192 at 2°C min<sup>-1</sup>, and from 192 to 230°C at 4°C min<sup>-1</sup>. Standards of endosulfan  $\alpha$  and  $\beta$  (Techrom, Mexico) were employed to determine the retention time, calibration curves, and pesticide concentrations.

*Surface tension and E<sub>24</sub> properties evaluation in soil samples:* To determine the *In situ* BASA production, 10 g of soil were taken out at, 0, 7, 14, and 30 days. The soil was added to 40 mL of deionized water and stirred at 180 rpm for 30 min, after this time the solution was filtered through a 540 Whatman filter paper and the liquid was used for ST and E<sub>24</sub>, evaluation, as it was previously described. Results are reported as the mean ± the standard deviation.

## **Results and discussion**

*Microorganism identification:* The fungus isolated from CsP was identified as *Penicillium crustosum* based on the frequency of the 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S segment. The isolated fungus presented 99% similarity with *P. crustosum* (Figure 1), and its nucleotide sequence was deposited in GenBank under the registration number MG009431.

*Effect of culture conditions on surface properties:* The parameters of the culture medium (C and N sources, pH, and agitation) were the independent variables selected for the ST and E<sub>24</sub> activity by *P. crustosum*, through a Taguchi L9 experimental design (Table 3), where a maximum value of ST and E<sub>24</sub> were obtained at days 6 and 12, respectively.

The lower value of ST ( $38.7 \pm 0.50 \text{ mN m}^{-1}$ ) was found in culture 6 (glucose, KNO<sub>3</sub>, 100 rpm, and pH = 5) after 6 days. The highest E<sub>24</sub> ( $43 \pm 0.15\%$ ) was determined in treatment 8 (CsP, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 100 rpm, and pH = 7) after 12 days, indicating that C and N sources played an important role on BASA surfactant properties.

Notably, in cultures 2,5 and 8, where NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> was used as a N source, a high value of E<sub>24</sub> was determined, as confirmed by the analysis of variances (Table 4), which showed a significant effect of the N source in the induction of E<sub>24</sub> activity. Satpute et al. [31] also reported that N sources have an important role in protein formation, cell growth, and enzyme production during fermentation processes.

Except agitation, all variables had a significant effect on E<sub>24</sub> activity, and a lower significance ( $p < 0.01$ ). Agitation speed is known to be positively correlated with dissolved oxygen in the medium (involved in oxidation reactions), mainly with the increase of oxygen [32].

Table 5 shows analysis of variances on Taguchi L9 experimental appreciating that all the variables play an important role in improvement of ST.

The importance of C and N sources could be associated at the structure of the hydrophilic phase, that was in contact with the non-polar phase.

There are scarce reports related to the effect of different C and N sources on *Penicillium* genera for BASA production; among them, grease, cooking oil waste, and soybean and cake oil as C sources, and yeast extract, peptone, malt extract, and NaNO<sub>3</sub> as N sources [15, 17, 33, 34].

Furthermore, at a pH of 5, the decreased in ST could be due to the organic acids produced by the fungus [35] as this low pH was maintained during the culture.

Agitation was significant ( $p < 0.0001$ ) and showed a negative correlation with ST, but it had no major effect on E<sub>24</sub> as was discussed.

Glucose and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> were selected for soil bioremediation since they induced both ST and E<sub>24</sub>; also a pH of 5 and 120 rpm were selected for the next experiments.

***Evaluation of the surface properties of BASA:*** Once the growth conditions were selected (glucose, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 120 rpm, pH = 5), the microorganism was cultivated for 14 days, having a lower value of ST (53.2 mN m<sup>-1</sup>) at day 8 and E<sub>24</sub> (27.1%) at day 12 (Figure 2).

The BASA obtained on the 12<sup>th</sup> day was semi-purified and a decrease in ST (37.7 mN m<sup>-1</sup>) and increase in E<sub>24</sub> (71.4%) was observed. Similar values were determined in cultures of *Trichosporon montevidense* where the ST was 44.9 mN m<sup>-1</sup> and E<sub>24</sub> was 75.8% with soybean oil and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as C and N sources respectively [18]. In other *Penicillium* spp., have been reported a high value for E<sub>24</sub> (up to 80%) but not ST [33], or a low ST value was determined (60.13 mN m<sup>-1</sup>) [34], for this reason, the production of BASA produce by *P. crustosum* is of great interest. These differences could be due to the differing metabolism of the *Penicillium* genus and the culture medium composition.

In other report [15] its analogous *P. chrysogenum* present a maximum value of E<sub>24</sub>= 38% (without purification) in a medium with grease waste, NaNO<sub>3</sub>, and pH=8, that was close to the one obtained in the present work. Where N source of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> were used, we can assume a similar behavior in E<sub>24</sub>, for a N limitation, since microorganisms must first reduce NO<sub>3</sub><sup>-</sup> to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> for N consumption.

**Analyses of semi-purified fungal broth extract:** The composition of the semi-purified extract of *P. crustosum* obtained was evaluated, having a composition of: 76% lipids, 20.9% proteins, and 3.1% carbohydrates; for that reason, the components in the crude extract could be classified as the lipopeptide BASA type, which was confirmed by FTIR analysis (Figure 3).

The peptide groups were determined by their absorption bands at  $3430\text{ cm}^{-1}$ , with stretching N–H absorption bands at  $1650\text{ cm}^{-1}$ , and stretching CO–N, with a confirmatory band at  $1540\text{ cm}^{-1}$ , that represented the deformation mode of the N–H bond and a narrowing of the C–N bonds [29]. In addition, peaks from  $3000$  to  $2800\text{ cm}^{-1}$  and from  $1450$  to  $1380\text{ cm}^{-1}$  revealed the presence of aliphatic chains, while those at  $1129$  and  $657\text{ cm}^{-1}$  represented other chains reported in surfactins produced by *Bacillus subtilis* [36]. Bands between  $669$  and  $1384\text{ cm}^{-1}$  were reported for other lipopeptides produced by its analogous *P. chrysogenum* [15]. As was previously discuss, these metabolites are known to have different compositions among different microorganisms, as well as C and N sources, because each source can affect the metabolic pathway of BASA properties [19].

**Evaluation of surface property stability of fungal extracts under different conditions:**

Figure 4 shows the effect of pH (A), temperature (B), and salinity (C) on the stability of ST,  $E_{24}$ , and  $E_{48}$  of the semi-purified extract produced by *P. crustosum*.

$E_{24}$ ,  $E_{48}$  and ST were stable up to  $80^{\circ}\text{C}$ , ST was not affected by changes in pH (2–12), but  $E_{24}$  and  $E_{48}$  were affected by a pH of 8–12. Salinity did not affect ST up to  $200\text{ g L}^{-1}$ ; however, it considerably influenced  $E_{24}$  activity. Nevertheless, the BASA produced by *P. crustosum* had several advantages over those produced by other microorganisms, since surfactin produced by *Bacillus* sp. was stable only in a pH range of 7–8 and low salinity up to  $2.5\% \text{ w v}^{-1}$  [37].

The surface properties of *P. crustosum* presented higher stability than its analogous *P. chrysogenum*, which was stable only in a pH range of 3–7 [15]. One possible explanation for these differences in the stability of the surface properties could be the structure and charge of BASA. Anionic surface agents tend to become unstable at low pH values, due to the

negative charge [38], although lipopeptide properties do not become stable under an acidic pH.

***Bioremediation of a contaminated soil with endosulfan and E. coli:*** Once the best growth conditions for *P. crustosum* and the BASA production had been identified, it was decided to apply it and its bio-product in saline soil contaminated with endosulfan and *E. coli*.

*Physicochemical characterization of soil:* Table 6 shows the properties of the soil used for *E. coli* elimination and endosulfan biodegradation assays.

This soil had a high salinity ( $27.2 \pm 2.4$  dS m<sup>-1</sup>) and a relatively high composition (25%) of silt and clay, which reduced the soil permeability, allowing the accumulation of xenobiotic compounds [10] and active surface agents [39].

*Inhibition of E. coli growth:* The BASA applied to the salty agricultural soil with a high content of *E. coli* ( $2.5 \times 10^5$ ) had a 99.8% decrease in the population after 8 days and a 100% decrease after 12 days. That could be explained by the accumulation of BASA in the cell wall of the microorganism, which implies an electrolyte imbalance due to the entry of a greater amount of Ca<sup>+2</sup> and H<sup>+</sup> ions into the cell. It also could be associated with the intercalation of the phospholipid bilayer in the membrane, altering the protein formation and the transport and generation of energy, leading to cell death [40]. Additionally, anionic surfactants could interact with macromolecules, such as peptides and enzymes, altering the biological function of microorganisms [41].

*Endosulfan degradation in the four systems:* The four systems previously described were evaluated for endosulfan biodegradation, showing that bioaugmentation with *P. crustosum* (FBR) yielded a higher degradation ( $87.8 \pm 6.3\%$ ) after 14 days. However, at this time there was no significant difference between this system and the one bioaugmented and with BASA (FBR-BASA); but they were different from the system just with BASA addition (BASA-E) and the control. In addition, endosulfan degradation by FBR increased slightly at 30 days, showing a significant difference from the other systems (Figure 5).

Additionally, the BASA-E system (with the native microorganisms) had a difference of 14.7% from the control after 14 days; however, at 30 days, it was 18.4% below the FBR system. This shows that the addition of BASA has a benefit if it is only used, but the addition of *P. crustosum* is better.

The FBR-BASA system have a final degradation of  $80.1 \pm 8.0\%$  after 30 days, a value that was 12% less than the FBR system. This behavior could be associated with the consumption of BASA by the microorganism, which may have been used as a substrate for growth instead of endosulfan degradation [4]. Therefore, we concluded that the best system for endosulfan removal was the FBR system.

Presumably, BASA can be produced *in situ* so that endosulfan can be available for fungal and native soil microorganism degradation, as confirmed by the evaluation of tensoactive and emulsifying activities (Table 7).

A maximum value of  $64.33 \text{ mN m}^{-1}$  for ST and 16.7% for  $E_{24}$  was found after 14 days and were lower than those values obtained in liquid medium. This behavior could be associated with a high organic matter content in the soil and a high clay percentage, which are necessary for BASA adsorption [39]. Notably, the C and N content in soil might be different than that in liquid medium, thus, the BASA characteristics might also change. Similar results were found for endosulfan biodegradation by Kataoka et al. [3], who found 70%  $\alpha$ -endosulfan and 50%  $\beta$ -endosulfan in soil after 28 days with *Mortierella* sp.

Awasthi et al. [42] found 75%  $\alpha$ -endosulfan and 68%  $\beta$ -endosulfan degradation after 20 days of treatment with a co-culture amended with surfactin. These results are similar to those obtained in the present work using the BASA-E system, which indicated the benefit of BASA for endosulfan degradation by native soil microorganisms and by the fungus itself, as it was mentioned in a previous work [43], where sulphate endosulfan and mono alcohol endosulfan, were detected as the main metabolites of endosulfan degradation by *P. crustosum*.

## Conclusions

This is the first report about the effect of the surface active agent properties produced by *P. crustosum* under selected culture conditions and its application to degrade endosulfan and

*E. coli* growth inhibition from agricultural salty soils. In addition, a Taguchi L9 experimental design was used to select the culture conditions to activate the BASA properties of *P. crustosum*. The C and N sources played an important role in the reduction of surface tension and increase of emulsifying activity.

The BASA was characterized as a lipopeptide that was stable at a pH of 2–12, 80°C, and 200 g L<sup>-1</sup> of salt for ST and pH 8–12 and 80°C for E<sub>24</sub>. The application of BASA in a soil contaminated with *E. coli* showed an inhibition of 100% for *E. coli* after 12 days, as well as an improvement of 14.7% in endosulfan degradation with the native soil microorganisms after 14 days.

Bioaugmentation by *P. crustosum* produced BASA *in situ* and enhanced endosulfan degradation to 92.9 ± 4.8% after 30 days of bioremediation treatment. That is of great contribution for the bioremediation of saline soils contaminated with hydrophobic organic compounds, as well as pathogens, such as *E. coli*.

### **Acknowledgement**

We thank to National Collection of Microbial Strains and Cell Cultures of CINVESTAV, Zacatenco for the identification of the microorganism.

### **Funding**

CONACYT PhD. scholarship 306251 for Anbu Landa-Faz.

### **Disclosure statement**

The authors declare no conflict of interest.

## References

- [1] Pérez-Belmont, P.; Alvarado, J.; Vázquez-Salvador, N.; Rodríguez, E.; Valiente, E.; Díaz, J. Water quality monitoring in the Xochimilco peri-urban wetland: experiences engaging in citizen science. *Freshwater Science*. **2019**, 38, 342-351.
- [2] Khalid, S.; Shahid, M.; Bibi, I.; Sarwar, T.; Shah, A.H.; Niazi, N.K. A review of environmental contamination and health risk assessment of wastewater use for crop irrigation with a focus on low and high-income countries. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. **2018**, 15, 895. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050895>.
- [3] Kataoka, R.; Takagi, K.; Sakakibara, F. A new endosulfan-degrading fungus, *Mortierella* species, isolated from a soil contaminated with organochlorine pesticides. *J. Pest. Sci.* **2010**, 35, 326-332. <https://doi.org/10.1584/jpestics.G10-10>.
- [4] Manickam, N.; Bajaj, A.; Saini, H.S.; Shanker, R. Surfactant mediated enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers by *Sphingomonas* sp. NM05. *Biodegradation*. **2012**, 23, 673–682. <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9543-z>.
- [5] Ahmad, K.S. Remedial potential of bacterial and fungal strains (*Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium chrysogenum*) against organochlorine insecticide Endosulfan. *Folia. microbiol.* **2020**, 65, 801-810. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00792-7>.
- [6] Menezes, R.G.; Qadir, T.F.; Moin, A.; Fatima, H.; Hussain, S.A.; Madadin, M.; Pasha, S.D.; Al Rubaish, F.A.; Senthilkumaran, S. Endosulfan poisoning: An overview. *J. Forensic. Leg. Med.* **2017**, 51: 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.07.008>.
- [7] Mukherjee, A.; Singh, K.V.; Das, S. Biodegradation and detoxification of chlorinated pesticide endosulfan by soil microbes. Endosulfan: Uses, Toxicological Profile and Regulation. In *Endosulfan*; Yadav, I.C., Devi, N.L., Nova science publishers Inc, 2019; Chapter 8.
- [8] Sharma, A.; Kumar, V.; Shahzad, B.; Tanveer, M.; Sidhu, G.P.S.; Handa, N.; Kohli, S.K.; Yadav, P.; Bali, A.S.; Parihar, R.D.; Dar, O.I.; Singh, K.; Jasrotia, S.; Bakshi, P.; Ramakrishnan, M.; Kumar, S.; Bhardwaj, R.; Thukral, A.K. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl. Sci.* **2019**, 1, 1446. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>

- [9] Halse, A.K.; Schlabach, M.; Schuster, J.K.; Jones, K.C.; Steinnes, E.; Breivik, K. Endosulfan, pentachlorobenzene and short-chain chlorinated paraffins in background soils from Western Europe. *Environ. Pollut.* **2015**, 196: 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.09.009>.
- [10] Leal, S.D.V.; Valenzuela, Q.A.I.; Gutiérrez, C.M.L.; Bermúdez, A.M.C.; García, H.J.; Grajeda, C.P.; Silveira, G.M.I.; Meza, M.M.M.; Palma, D.A.; Leyva, G.G.N.; Camerena, G.B.O.; Valenzuela, N.C.P. Residuos plaguicidas organoclorados en suelos agrícolas. *Tierra Latinoamericana*. **2014**, 32, 1-11.
- [11] Zhang, S.; Yue, H.E.; Linna, W.U.; Jinzhong, W.A.N.; Mao, Y.E.; Tao, L.O.N.G.; Zhou, Y.A.N.; Xin, J.I.A.N.G.; Yusuoc, L.I.N.; Xiaohua, L.U. Remediation of Organochlorine Pesticide-Contaminated Soils by Surfactant-Enhanced Washing Combined with Activated Carbon Selective Adsorption. *Pedosphere*. **2019**, 29, 400-408. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60328-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60328-X).
- [12] Bachmann, R.T.; Johnson, A.C.; Edyvean, R.G.J. Biotechnology in the petroleum industry: An overview. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. **2014**, 86, 225–237. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.011>.
- [13] Mani, A.; Hameed, S.S.; Ramalingam, S.; Kaliamoorthi, R. Effect of rhamnolipid potential on biodegradation of endosulfan by *Pseudomonas aeruginosa* in batch studies. *J. Biosci. Technol.* **2011**, 2, 268-278. <https://doi.org/268-278>. 10.13140/RG.2.2.29228.31360.
- [14] Odukkathil, G.; Vasudevan, N. Biodegradation of endosulfan isomers and its metabolite endosulfate by two biosurfactant producing bacterial strains of *Bordetella petrii*. *J. Env. Sci. Heal. B*. **2015**, 50, 81-89. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.975596>.
- [15] Gautam, G.; Mishra, V.; Verma, P.; Pandey, A.K.; Negi, S. A Cost Effective Strategy for Production of Bio-surfactant from Locally Isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and Its Applications. *J. Bioprocess. Biotech.* **2014**, 4, 6. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000177>.
- [16] Ishaq, U.; Akram, M.S.; Iqbal, Z.; Rafiq, M.; Akrem, A.; Nadeem, M.; Shafi, F.; Shafiq, Z.; Mahmood, S.; Baig, M.A. Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from *Aspergillus flavus*. *J. App. Microbiol.* **2015**, 119, 1035-1045. <https://doi.org/10.1111/jam.12929>.

- [17] Luna-Velasco, M.A.; Esparza-García, F.; Cañizares-Villanueva, R.O.; Rodríguez-Vázquez, R.; Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. *Process. Biochem.* **2007**, 42, 310-314. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.08.015>.
- [18] Monteiro, A.S.; Coutinho, J.O.; Júnior, A.C.; Rosa, C.A.; Siqueira, E.P.; Santos, V.L. Characterization of new biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA 72 isolated from dairy industry effluents. *J. Basic. Microbiol.* **2009**, 49, 553-563. <https://doi.org/10.1002/jobm.200900089>.
- [19] Martínez-Toledo, A.; Rodríguez-Vázquez, R. Response surface methodology (Box-Behnken) to improve a liquid media formulation to produce biosurfactant and phenanthrene removal by *Pseudomonas putida*. *Ann Microbiol.* **2011**, 61, 605-613. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0179-0>.
- [20] Wu, J.Y.; Yeh, K.L.; Lu, W.; Bin Lin, C.L.; Chang, J.S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresour.*
- [21] Pinzón Bedoya, M.L.; Tamayo, A.M.C. Caracterización de la cáscara de naranja para su uso como material bioadsorbente. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas.* **2008**, 6,1-23.
- [22] Food and Agriculture Organization (FAO). Citrus Fruit - Fresh and Processed Statistical Bulletin. <http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf>. (Accessed: May, 2020).
- [23] Louw, J.P.; Korsten, L. Pathogenicity and host susceptibility of *Penicillium* spp. on citrus. *Plant. Disease.* **2015**, 99, 21-30. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0122-RE>.
- [24] Yadav, A.N.; Verma, P.; Kumar, V.; Sangwan, P.; Mishra, S.; Panjiar, N.; Gupta, V.K.; Saxena, A.K. Biodiversity of the genus *Penicillium* in different habitats. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*; Kumar Gupta, V., Rodriguez-Couto, S., Elsevier, 2018. Chapter 1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00001-6>.
- [25] Pruthi, V.; Cameotra, S.S. Short Communication: Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface-active properties by *Serratia marcescens*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **1997**,13,133–135 <https://doi.org/10.1007/BF02770821>.
- [26] Pornsunthorntawe, O.; Arttaweeporn, N.; Paisanjit, S.; Somboonthanate, P.; Abe, M.; Rujiravanit, R.; Chavadej, S. Isolation and comparison of biosurfactants produced by

- Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. *Biochem. Eng. J.* **2008**, 42, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.06.016>.
- [27] Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.T.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **1956**, 28: 350–356. <https://10.1021/ac60111a017>.
- [28] Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [29] De Faria, A.F.; Teodoro-Martinez, D.S.; De Oliveira-Barbosa, G.N.; Gontijo-Vaz, B.; Serrano-Silva, Í.; Garcia, J.S.; Rogério-Tótolac, M.; Eberlinb, M.N.; Grossmand, M.; Alveb, O.L.; Durrant, L.T. Production and structural characterization of surfactin (C 14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process. Biochem.* **2011**, 46, 1951–1957. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.00>.
- [30] United States Environmental Protection Agency (US EPA). Method 3546, Microwave Extraction, in: Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical Chemical Methods (SW–846). <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3546.pdf>. (Accessed: July, 2019).
- [31] Satpute, S.K.; Bhuyan, S.S.; Pardesi, K.R.; Mujumdar, S.S.; Dhakephalkar, P.K.; Shete, A.M.; Chopade, B.A. Molecular Genetics of Biosurfactant Synthesis in Microorganisms. In *Sen R. (eds) Biosurfactants. Advances in Experimental Medicine and Biology*; Sen, R. Springer, 2010. Chapter 2. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9>.
- [32] Ghribi, D.; Ellouze-Chaabouni, S. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. *Biotechnol. Res. Int.* **2011**, 1–6. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/653654>.
- [33] Camargo-de-Morais, M.M.; Ramos, S.A.F.; Pimentel, M.C.B.; De Morais, M.A.; Lima Filho, J.L. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 9, 191–194. <https://doi.org/10.1023/A:1023299111663>.
- [34] Yuan, H.L.; Yang, J.S.; Chen, W.X. Production of alkaline materials, surfactants and enzymes by *Penicillium decumbens* strain P6 in association with lignite

- degradation/solubilization. *Fuel*. **2006**, 85, 1378–1382.  
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2005.12.003>.
- [35] Izcapa-Treviño, C.; Loera, O.; Tomasini-Campocosio, A.; Esparza-Garcia, F.; Salazar-Montoya, J.A.; Díaz-Cervantes, M.D.; Rodríguez-Vázquez, R. Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe) reaction involved in *Penicillium* sp. culture for DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane] degradation. *J. Environ. Sci. Health. B*. **2009**, 44, 798-804.  
<https://doi.org/10.1080/03601230903238368>.
- [36] El-Sheshtawy, H.S.; Aiad, I.; Osman, M.E.; Abo-ELnasr, A.A.; Kobisy, A.S. Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. *Egypt. J. Pet*. **2015**, 24, 155–162.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.05.005>.
- [37] Varadavenkatesan, T.; Murty, V.R. Production of a lipopeptide biosurfactant by a novel *Bacillus* sp. and its applicability to enhanced oil recovery. *Int. Sch. Res. Notices*. **2013**, 621519. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/621519>.
- [38] Čipinytė, V.; Grigiškis, S.; Šapokaitė, D.; Baškys, E. Production of biosurfactants by *Arthrobacter* sp. N3, A hydrocarbon degrading bacteria. *Env. Technol. Resour*. **2011**, 1, 68-75.
- [39] Lee, J.F.; Hsu, M.H.; Lee, C.K.; Chao, H.P.; Chen, B.H. Effects of soil properties on surfactant adsorption. *J. Chin. Inst. Chem. Eng*. **2005**, 28, 375-379.  
<https://doi.org/10.1080/02533839.2005.9671004>.
- [40] Ndlovu, T.; Rautenbach, M.; Vosloo, J.A.; Khan, S.; Khan, W. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. *AMB Express*. **2017**, 7, 108. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0363-8>.
- [41] Mao, X.; Jiang, R.; Xiao, W.; Yu, J. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review. *J. Hazard. Mater*. **2015**, 285, 419-435.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.009>.
- [42] Awasthi, N.; Kumar, A.; Makkar, R.; Cameotra, S.S. Biodegradation of soil-applied endosulfan in the presence of a biosurfactant. *J. Environ. Sci. Health. B*. **1999**, 34, 793-803.  
<https://doi.org/10.1080/03601239909373226>.

- [43] Landa-Faz, A.; Rodríguez-Vázquez, R.; Roldán-Carillo, T.G. Mycoremediation of an agricultural salty soil contaminated with endosulfan by *Penicillium crustosum*: And agronomic bioassays with *Phaseolus leptostachyus*. *Research Square*. **2020**. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-117438/v1>
- [44] Mohanasrinivasan, V.; Suganthi, V.; Selvarajan, E.; Subathra Devi, C.; Ajith, E.; Muhammed Farhan, N.P.; Gopalakrishnan, S. Bioremediation of endosulfan contaminated soil. *Res. J. Chem. Environ.* **2013**, 17, 93-101.
- [45] Bisht, J.; Harsh, N.S.K.; Palni, L.M.S.; Agnihotri, V.; Kumar, A. Biodegradation of chlorinated organic pesticides endosulfan and chlorpyrifos in soil extract broth using fungi. *Remediation J.* **2019**, 29 (3), 63-77. <https://doi.org/10.1002/rem.21599>.

## Tables

**Table 1.** Endosulfan biodegradation in soil by different microorganisms.

<b>Microorganism</b>	<b>Removal (%)</b>	<b>Time (days)</b>	<b>References</b>
<i>Mortierella</i> sp.	70 endosulfan $\alpha$ 50 endosulfan $\beta$	28	[3]
Co-culture and Surfactin	75 endosulfan $\alpha$ 68 endosulfan $\beta$	20	[42]
<i>Bacillus</i> sp.	81.6	30	[44]
<i>Penicillium</i> sp.	80		
<i>Tramete shirsuta</i>	100		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	96.87		
<i>Trametes versicolor</i>	90.96	15	[45]
<i>Penicillium Frequentans</i>	90.80		

**Table 2.** Culture conditions used in the Taguchi L9 experimental design for BASA production.

Levels	1	2	3
Carbon source	Soybean oil	Glucose	CsP
Nitrogen source	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	Peptone
pH	3	5	7
Agitation speed (rpm)	100	120	150

C/N ratio: 20; CsP: *Citrus sinensis* peel

**Table 3.** Matrix of Taguchi L9 experimental design and results.

Cultures	Carbon source	Nitrogen source	Agitation (rpm)	pH	ST (6 days) (mN m <sup>-1</sup> )	E <sub>24</sub> (12 days) (%)
1	Soyben oil	Peptone	100	3	45.2 ± 1.5	0.0 ± 0.0
2	Soyben oil	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	120	5	42.3 ± 0.3	40.5 ± 0.0
3	Soyben oil	KNO <sub>3</sub>	150	7	45.3 ± 1.0	7.1 ± 0.0
4	Glucose	Peptone	120	7	41.9 ± 0.6	7.14 ± 0.0
5	Glucose	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	150	3	48.3 ± 0.5	29.5 ± 0.1
6	Glucose	KNO <sub>3</sub>	100	5	38.7 ± 0.5	14.0 ± 0.1
7	CsP	Peptone	150	5	46.7 ± 0.2	7.9 ± 0.1
8	CsP	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	100	7	55.8 ± 0.3	43.8 ± 0.1
9	CsP	KNO <sub>3</sub>	120	3	43.4 ± 0.1	11.1 ± 0.2

Growth temperature: 30 °C; C/N ratio: 20; CsP: *Citrus sinensis* peel; ST: Surface tension; E<sub>24</sub>: Emulsifying activity at 24 h; means values with SD (n=3).

**Table 4** Analysis of variances on Taguchi L9 experimental design for variable response E<sub>24</sub>

	SS	DF	MS	F	P
C source	203.34	2	101.67	12.31	0.0004
N source	5006.88	2	2503.44	303.11	0.00001
Agitation speed	92.17	2	46.08	5.58	0.01
pH	198.21	2	99.117	11.99	0.0005
Residuals	148.66	18	8.26		

SS: Sum of squares; DF: Degrees of freedom; F: Statistical value; P: calculated value

**Table 5** Analysis of variances on Taguchi L9 experimental design for variable response ST

	Ss	Df	MS	F	P
C source	218.58	2	109.29	190.03	< 0.0001
N source	189.24	2	94.62	164.53	< 0.0001
Agitation speed	112.23	2	56.11	97.57	< 0.0001
pH	94.85	2	47.43	82.47	< 0.0001
Residuals	10.35	18	0.58		

SS: Sum of squares; DF: Degrees of freedom; F: Statistical value; P: calculated value

**Table 6.** Soil physicochemical characterization.

<b>Characteristics</b>	<b>Values</b>
pH	7.4 ± 0.8
Electric conductivity (dS m <sup>-1</sup> )	27.2 ± 2.4
Humidity (%)	90.7 ± 5.4
Organic carbon (%)	12.5 ± 0.2
Organic matter (%)	21.6 ± 0.3
Total nitrogen (%)	0.8 ± 0.1
Soluble phosphorus (mg kg <sup>-1</sup> )	10.7 ± 0.5
C/N ratio	15.6
Sand (%)	33.0 ± 2.3
Clay (%)	36.2 ± 0.3
Silt (%)	30.7 ± 2.0
Soil classification	Clay loam soil

Means values with SD (n = 3).

**Table 7.** Tensioactive and emulsifying activities induced in the FBR system.

<b>Day</b>	<b>ST</b>	<b>E<sub>24</sub></b>
	(mN m <sup>-1</sup> )	(%)
0	0	0
7	67.7 ± 0.5	8.9 ± 0.2
14	64.3 ± 0.5	16.7 ± 0
30	67.3 ± 0.5	0

ST: Surface Tension; E<sub>24</sub>: Emulsifying activity with diesel at 24 h. Means values with SD (n=3).

### Figure captions

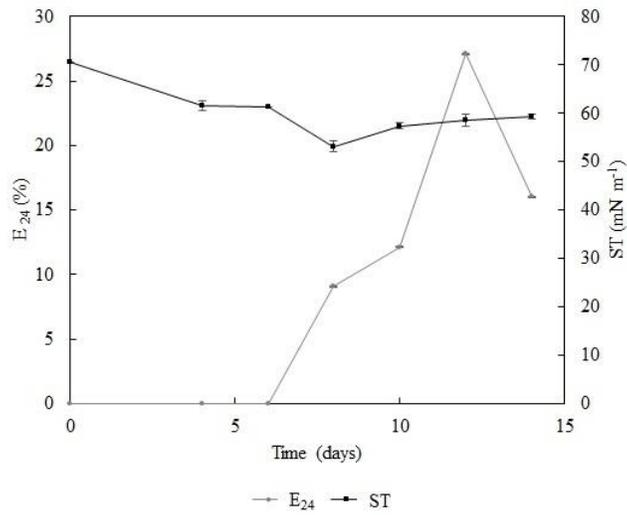
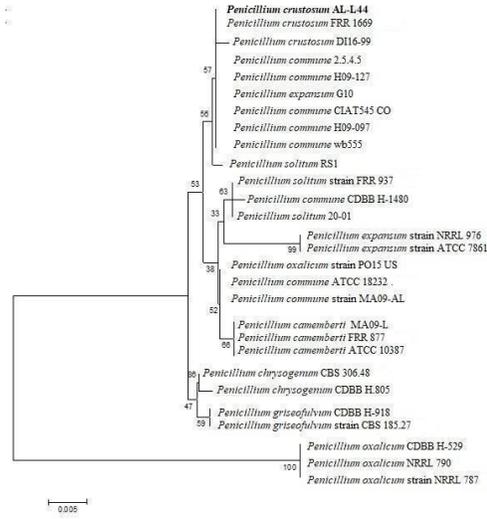
**Figure 1.** Phylogenetic dendrogram of *Penicillium crustosum*.

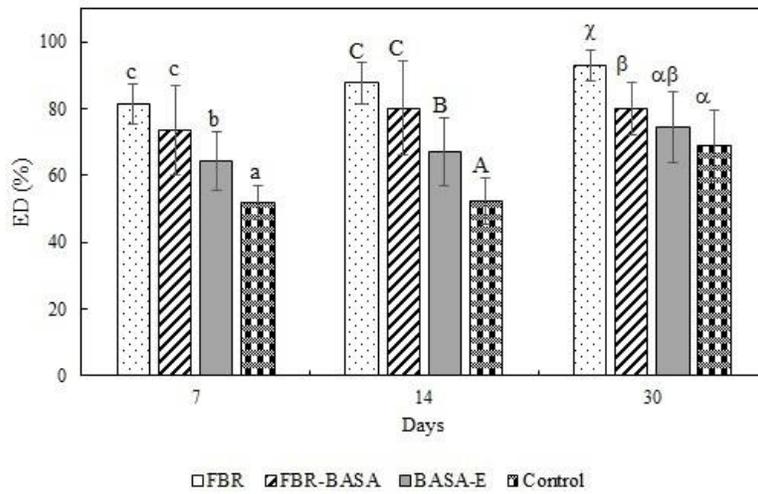
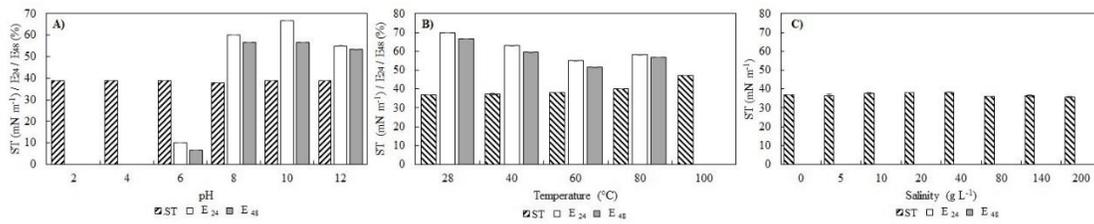
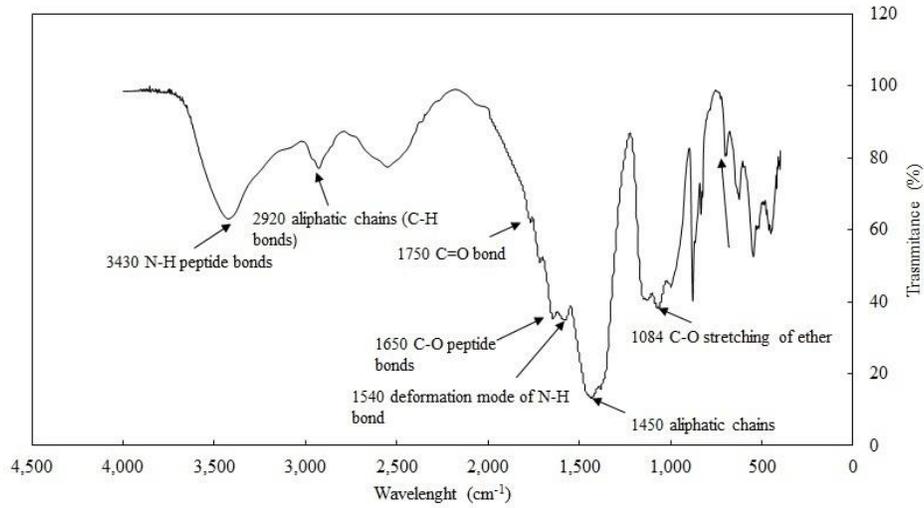
**Figure 2.** Evaluation of ST and E<sub>24</sub> activity by *P. crustosum* from 0 to 14 days (n=3, 30°C, 120 rpm, glucose, and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>). Points represent means with SD (n=3).

**Figure 3.** Infrared spectrum of BASA produced by *P. crustosum* after 12 days at 30°C and 120 rpm, glucose and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> supplementation, and HCl 6 M acidification, followed by extraction with chloroform:ethanol solution.

**Figure 4.** Stability of ST, E<sub>24</sub>, and E<sub>48</sub> of BASA produced by *P. crustosum* at different conditions of A) pH, B) temperature, and C) salinity. Bars represent means with SD (n = 3).

**Figure 5.** Endosulfan degradation by different treatments after 7, 14, and 30 days in serologic bottles (125 mL) maintained at 25°C and 80% moisture. Bars represent means with the SD (n = 3). Different letters indicate statistically significant differences by LSD analysis.





# Effect of the Pesticide Endosulfan and Two Different Biostimulants on the Stress Responses of *Phaseolus leptostachyus* Plants Grown in a Saline Soil

Anbu Landa-Faz <sup>1,2</sup> Sara González-Orenga <sup>3</sup>, Monica Boscaiu <sup>3,\*</sup>, Refugio Rodríguez-Vázquez <sup>2</sup> and Oscar Vicente <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for the Conservation and Improvement of Valencian Agrodiversity (COMAV), Universitat Politècnica de València, Camino de Vera 14, 46022-Valencia, Spain; anbu.landafaz@cinvestav.mx (A.L.-F.); ovicente@upvnet.upv.es (O.V.)

<sup>2</sup> Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV Zacatenco, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, Del. Gustavo A. Madero, 07360 Ciudad de México, México; [rodrig@cinvestav.mx](mailto:rodrig@cinvestav.mx)

<sup>3</sup> Mediterranean Agroforestry Institute (IAM), Universitat Politècnica de València, Camino de Vera 14, 46022-Valencia, Spain; sagonor@doctor.upv.es

\* Correspondence: mobosnea@eaf.upv.es

**Abstract:** Soil salinity and the indiscriminate use of agrochemicals has significantly reduced the productivity of the 'Chinampas' agroecosystem in Mexico City. Crop improvement under these stressful conditions may be achieved by soil bioremediation. In this study, we checked the effects of the organochlorine pesticide endosulfan and bioremediation with *Penicillium crustosum* or a citric waste on the growth of *Phaseolus leptostachyus* plants in saline soil from the Chinampas area. Biochemical markers associated with specific stress responses were also determined after one month of growth in the different substrates. Plant growth was stimulated by bioremediation of the soil. Both biostimulants reduced the degree of stress affecting the plants, as shown by the increase in photosynthetic pigments and the reduction of proline, malondialdehyde (MDA), and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents, and the activation of antioxidant systems. However, the biostimulants appeared to mitigate oxidative stress through different mechanisms. Endosulfan contamination inhibited seed germination—which was reverted to control values in the presence of the biostimulants—and further decreased plant growth. No clear patterns of variation of biochemical stress markers were observed combining endosulfan and the biostimulants. In any case, bioremediation with *P. crustosum* and/or citric waste is recommended to improve the germination and growth of *P. leptostachyus* plants.

**Keywords:** chinampas agroecosystem; organochlorine pesticides; seed germination; salt stress; oxidative stress; oxidative stress markers; antioxidant systems; proline

---

## 1. Introduction

Xochimilco is an area southeast of Mexico City, a remnant of an ancient wetland region consisting of five lakes that has suffered anthropogenic alterations over the last 2000 years. Pre-Columbian intensive agriculture was practiced in this area on narrow raised platforms surrounded by canals and ditches, known as 'chinampas', a term that also refers to this type of agriculture [1,2]. Chinampas soils are unique in the world, representing a cultural heritage from the pre-Hispanic period; they are still used as a distinctive agroecosystem, with high sustainability and supporting a large biodiversity. The Chinampa zone of Xochimilco allows a type of urban farming with great potential for a modern megalopolis, and still provides a source of income for a significant part of the Mexico City population [2]. The area has been used for horticulture for thousands of years, but it has experienced several environmental problems since the last century [2]. Due to overexploitation of water resources, the water level decreased. To mitigate this problem, since 1959, the water level has been raised using wastewater, which contains a high concentration of salts, toxic metals, and endocrine disruptors such as organochlorinated pesticides [3,4]. These actions resulted in a sharp increase in water salinity in the canals, which was often reported to be around 0.5 g per liter [5]. The salinity of the soils varied considerably according to their location, but the concentration of salts in the upper layers during the dry season can reach values above 16 dS m<sup>-1</sup>, indicating severe salinity, reaching in some cases values as high as 45–50 dS m<sup>-1</sup> [6]. Salinity is already one of the major constraints for agriculture, and salinized areas are increasing continuously at a global scale [7,8]. Salinity is becoming more extensive because of land clearing, unsustainable irrigation practices, and bringing marginal land into production [9]. Because of this situation, only 1693 ha were harvested in 2018 in Xochimilco, representing 17% of the total cultivation area [10]. Plant growth on saline soils is directly affected by the osmotic stress and ion toxicity components of salt stress, to which most plant species, including all standard crops, are susceptible [11].

An additional environmental problem in the 'Chinampas' area is the use of pesticides, which increased steadily from the 1940s until the last decade of the 20th century [12]. The polluting effect of chemical pesticides is now well known; only a small fraction of the product applied reaches the pest, whereas the rest remains in the environment, contaminating soil, water, and biota [13]. One of the pesticides commonly used in the area is endosulfan, a broad-spectrum organochlorine insecticide, highly soluble in fats, with slow biodegradability and long persistence in the environment; in the soil, the half-life of endosulfan under aerobic conditions can be up to six

years [14]. Endosulfan is transformed into more toxic and more bioaccumulative derivatives through biological oxidation and enzymatic oxidative processes [15]. For this reason, this pesticide has been banned in more than 50 countries, including the EU; in Central and South America, however, endosulfan is one of the most widely acquired pesticides and is still used in several countries, including Mexico [16]. Due to the long-lasting effects and slow biodegradability of organochlorine insecticides, environmental problems may remain several years after the ban. These compounds can cause serious health problems, including endocrine disruption, adverse effects on the nervous and reproductive systems, shortness of breath, decreased respiration, convulsions, physical deformities, mental disorders, abortions, cancer, and delayed sexual maturity [17,18]. One efficient way of solving this type of soil contamination could be based on bioremediation. This term is used for the process of cleaning up contaminated areas using biological organisms such as bacteria, molds and yeasts, algae, and some plants, in the presence of oxygen and nutrients to accelerate the natural biodegradation processes. Different fungi species can be included among the microorganisms used for bioremediation. The genus *Penicillium* stands out, being present in a wide range of habitats, soil and vegetation, indoor environments, and various foodstuffs. These are non-ligninolytic fungi, tolerant to pesticides and with the ability of biodegradation of such chemical compounds [19]. In the area of study, bioremediation with *Penicillium* has proved efficient to remove 4,4-DDT (4,4'-Dichlorodiphenyltrichloroethane) and endosulfan sulfate in laboratory setups and in the field [12].

*Phaseolus leptostachyus* Bentham belongs to a small monophyletic group within its genus, characterized by a dysploid karyotype with 20 chromosomes, instead of the 22 chromosomes general in the genus *Phaseolus* [20], and distributed from Mexico to Costa Rica [21]. The species is a short-lived perennial with a tuberous root, surviving up to 4 years, reported to be tolerant to salinity [22], drought, and heat [21]. It can withstand moderate grazing or mowing for road maintenance, which often contributes to its persistence on roadsides, but usually grows in open natural areas such as slopes and landslides [21], and also in open forests [23]. It is an edible species, occasionally consumed and cultivated in Mexico [24]. Due to its relative stress tolerance, *P. leptostachyus* seems to be suitable for growth in areas with salinity problems, where more salt susceptible crops would not survive. Legume species can contribute to sustainable cropping systems by fixing nitrogen, increasing soil fertility, and supporting biodiversity [25].

*Phaseolus leptostachyus* has been losing agricultural importance in Mexico over the years; from 2016 to 2018, its production decreased, down to 0.5% of the total *Phaseolus* production [26], and now is not included in the national economic indicators.

Plants grown in saline soils activate stress response mechanisms, including growth inhibition, accumulation of specific osmolytes for osmotic adjustment, or activation of antioxidant systems to counteract

the secondary oxidative stress associated with salinity [27,28]. Endosulfan, like other pesticides, represents an additional stress factor for crops, which, combined with increased salinity, may have a strong inhibitory effect on plant growth. To overcome these limiting factors, biostimulants can be used. The primary aim of this work was to assess the effects of this pesticide on the plants cultivated in the Chinampas zone of Mexico City and the possibility to remediate the contaminated soil with biostimulants. Therefore, it was evident that natural saline soil from this area should be used as the substrate, even though we were aware that it would not provide the optimal conditions for plant growth. Indeed, even low soil salinity levels (below 2 dS m<sup>-1</sup>) can significantly reduce crop productivity [29]. At a salinity equivalent to 100 mM NaCl, pod yield per plant decreased by 85% in the common bean [30]. Therefore, the study was performed on the salt tolerant, related species *Phaseolus leptostachyus*, which is locally cultivated in this area. With this objective in mind, we have analyzed the responses of plants grown for one month in saline soils sampled from the natural Chinampas area, combined with endosulfan, citrus waste, and *Penicillium crustosum* (as biostimulants), or a combination of the pesticide and the biostimulants. To get insights into the physiological and biochemical mechanisms underlying those responses, growth parameters were correlated with the levels of photosynthetic pigments, osmolytes (proline and total soluble sugars), oxidative stress markers [malendialdehyde, (MDA) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>], and non-enzymatic (phenolic compounds) and enzymatic [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), aspartate peroxidase (APX), and glutathione reductase (GR)] antioxidants.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Physicochemical Characterization of the Soil

A saline agricultural soil from the 'Chinampas' area of Xochimilco, Mexico City, with the following geolocation: N 19°16'24.9", W 99°05'29.9", was used as the substrate for the potted plants in the greenhouse. The soil was physico-chemically characterized, using five randomly collected samples, according to the Mexican standard norm NMX-021 [31]. Soil pH and conductivity were measured using a 1:5 dilution (soil: deionized water), and the extract was analyzed with a multiparameter equipment HANNA, model HI9828. Carbon and organic matter content were determined by calcination of the soil at 350 °C for 8 h in Sola Basic flasks. The nitrogen content (%) was determined by the Microkjendalh method with a FOSS brand digester, model TECATOR 20, and a BÜCHI distiller, model K-314. Soluble phosphorus (%) was quantified according to Olsen methodology in a Shimadzu model UV-1800 spectrophotometer. Soil texture was determined by the Bouyoucos method with a hydrometer [32].

The electrical conductivity in the pot substrate was measured at the end of the treatments, when the biological material was sampled, in 1:5 (soil: water) suspension with a Crison 522 Conductivity-meter (Crison Instruments SA, Barcelona, Spain).

## 2.2. Plant Material and Treatments

Bayo beans (*Phaseolus leptostachyus*) brand 'La Merced', México, were cultivated in 6 types of substrates, all based on the saline soil collected in the field mentioned above: the saline soil without any treatment (Control, C); the saline soil with 1% of *Penicillium crustosum* (Control Pc, CPc), the saline soil with 1% of citric waste (Control CW, CCW), the saline soil with 1 mg kg<sup>-1</sup> of endosulfan (CE), and two CE-bioremediated soils, one with the inoculum *P. crustosum* (EPC) and the second with citric waste (ECW). The bioremediation with EPC and ECW was performed by pre-treatment of the different substrates for one month, before sowing the bean seeds (data not shown).

The pesticide used in this study was commercial granulated endosulfan (GOWAN, Mexico), diluted in hexane to prepare a stock solution with a concentration of 10 mg L<sup>-1</sup>, which was added to the soil to have a final concentration of 1 mg kg<sup>-1</sup>. Once the solution was added to the soil, it was stirred vigorously for 18 h to obtain a homogeneous distribution of the endosulfan. This concentration is above that measured in the soils of the study area (from 0.013 to 0.025 mg kg<sup>-1</sup> [33]), but values up to 6.7 mg kg<sup>-1</sup> have been reported in Mexico [34]; therefore, an intermediate concentration of the pesticide was chosen for the present study.

The citric waste, consisting of orange (*Citrus sinensis*) peels, was washed and the bagasse (fruit residue) was removed. Once cleaned, the peel waste was cut into 2 mm-disks, and incubated for five days at 30 °C, keeping the relative humidity at 80%. After this time, the formation of a green layer was appreciated (CW sample), from which the fungus *Penicillium crustosum* was isolated, as described [35]; *P. crustosum* was identified based on the sequence of the ribosomal RNA genes, which were submitted to GeneBank (accession number MG009431).

The microorganism *P. crustosum* was incubated for five days in a 500 mL Erlenmeyer flask containing 250 mL of Wunder mineral medium at pH 5.0 (buffered with 10% tartaric acid), shaken at 120 rpm and 30 °C. After this incubation period, the pellets were collected by filtration through a Whatman 540 filter, and the wet biomass was determined; finally, *P. crustosum* was added to the soils corresponding to Control PC and EPC substrates, at 1% (*w/w*) concentration. The soils corresponding to Control CW and ECW, contained 1% (*w/w*) of the CW sample.

The seeds were individually germinated and grown in small, 10 cm-high pots, with 20 g of soil each. The pots were incubated in a growth chamber with a photoperiod of 14 h of light, at 28 and 18 °C (day/night temperatures), and relative humidity between 60 and 65% during the day and 95–100% at night. Watering of the plants was performed twice a week with 10 mL of deionized water per pot for one month. Five plants were used as biological replicas per treatment.

## 2.3. Seed Germination and Plant Growth Parameters

The germination percentages of the seeds in the different substrates were recorded. One month after seedling emergence, the following growth parameters were measured for each plant: root

length (RL), stem length (SL), and fresh weight of roots (RFW), stem (SFW) and leaves (LFW). A fraction of the leaf material was weighed (FW), dried at 65 °C for 72 h, and weighed again (dry weight, DW) to calculate the leaf water content percentage according to the formula:  $WC (\%) = [(FW-DW)/FW] \times 100$ . The remaining plant material was flash-frozen in liquid N<sub>2</sub> and stored at -75 °C for the biochemical analyses.

#### 2.4. Quantification of Photosynthetic Pigments

Chlorophylls a (Chl a) and b (Chl b) and total carotenoids (Caro) contents were determined following the Lichtenthaler and Wellburn method [36], using fresh leaf material. The extraction was performed from 0.1 g of fresh leaves, ground in the presence of 30 mL of 80% (v/v) ice-cold acetone. The samples were mixed overnight in an orbital shaker and centrifuged at 13,300 g for 15 min at 4 °C. The absorbance of the supernatants was measured at 663, 646, and 470 nm with a UV-Vis spectrophotometer, VWR model UV 1600 PC. The concentration of each compound was calculated according to the equations in the original protocol [36] and expressed as 'mg g<sup>-1</sup> DW'. Additionally, the ratio Chl a/Chl b was calculated.

#### 2.5 Osmolyte Quantification

Proline (Pro) content was determined using fresh leaf material, according to the ninhydrin-acetic acid method [37]. Extracts were prepared in 3% aqueous sulfosalicylic acid and centrifuged at 13,300 g for 15 min. The supernatant was mixed with ninhydrin and acetic acid, incubated for one h at 95 °C, cooled on ice and then extracted with toluene. After centrifugation, the absorbance of the organic phase was read at 520 nm using toluene as the blank. Reaction mixtures containing known Pro concentrations were run in parallel to obtain a standard curve. Pro concentration was expressed as μmol g<sup>-1</sup> DW.

Total soluble sugars (TSS) were extracted and quantified according to the classical method of Dubois et al. [38]. Leaf extracts, prepared in 80% (v/v) methanol, were shaken on a rocker shaker for 24 h and centrifuged at 13,300 g for 10 min. The supernatants were collected and mixed with concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 5% phenol. The absorbance of the resulting solution was determined at 490 nm. TSS content was expressed as 'mg equivalent of glucose', used as the standard (mg eq. gluc g<sup>-1</sup> DW).

#### 2.6. Oxidative Stress Markers and Total Phenolic Compounds

Malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) contents were measured in the plants to assess their level of oxidative stress under different experimental conditions. MDA concentration was determined according to Hodges et al. [39], with the modifications introduced by Taulavori et al. [40], using the same methanol extracts prepared for TSS determination. The extracts were mixed with a solution of 0.5% thiobarbituric acid (TBA) in 20% trichloroacetic acid (TCA) (or with 20% TCA without TBA, for the control), and the samples were incubated at 95 °C for 15 min, cooled on ice and centrifuged at

13,300 × g for 10 min at 4 °C. The absorbance of the supernatants was measured at 532, 600, and 440 nm, and the MDA content was calculated with the equations previously described [40], based on the molar extinction coefficient at 532 nm of the MDA-TBA adduct (155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). MDA contents were expressed as 'nmol g<sup>-1</sup> DW'.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content was calculated according to Loreto and Velikova [41], with minor modifications. Extracts of fresh leaf material were prepared in 0.1% TCA and mixed with TRIS buffer and 1 M KI. Samples with known amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were assayed in parallel to obtain a reference curve. The absorbance of the samples was measured at 390 nm, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration was expressed as 'nmol g<sup>-1</sup> DW'.

Total phenolic compounds (TPC), taken as representative non-enzymatic antioxidants, were quantified in 80% (v/v) methanol extracts according to Blainski et al. [42]. The extracts were mixed with the Folin-Ciocalteu reagent and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; after incubation for 90 min at room temperature in the dark, the absorbance of the samples was measured at 765 nm. TPC contents were expressed as gallic acid equivalents (mg eq GA g<sup>-1</sup> DW), used as the standard.

### 2.7. Antioxidant Enzyme Activities

Four antioxidant enzymes were evaluated: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and glutathione reductase (GR). The preparation of the protein extracts followed Gil et al. [43], and protein quantification in the crude extracts was according to Bradford [44] using the BioRad commercial reagent and bovine serum albumin (BSA) as the standard.

SOD activity was calculated according to Beyer and Fridovich [45] by measuring spectrophotometrically, at 560 nm, the inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) photoreduction in a reaction mixture containing riboflavin as the source of superoxide radicals. One SOD unit was defined as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of the NBT photoreduction under the assay conditions. CAT activity was determined according to Aebi [46], following the consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> added to the extract by the decrease in absorbance at 240 nm. One CAT unit was defined as the amount of enzyme necessary to decompose one mmol of hydrogen peroxide per minute at 25 °C, the assay temperature. APX activity was measured as described by Nakano and Asada [47], following, at 290 nm, the oxidation of ascorbate by the plant extract. One APX unit was defined as the amount of enzyme required to catalyze the consumption of one mmol of ascorbate per minute at 25 °C. GR activity was determined according to Connell and Mullet [48], following, at 340 nm, the oxidation of NADPH during the GR-catalyzed reduction of oxidized glutathione (GSSG) to its reduced form (GSH). One GR unit was defined as the amount of enzyme to oxidize one mmol of NADPH per minute at 25 °C.

### 2.8. Statistical Analyses

The program IBM SPSS Statics 25 was used for the statistical analysis of the experimental data. Normality of the data was checked

by the Shapiro–Wilk test and the homogeneity of variance by the Levene’s test. One-way ANOVAs were performed, at the 99% confidence level, independently for each experiment, using the Tukey HSD test to make post-hoc comparisons. All mean values mentioned in figures and tables include the standard deviation (SD). A principal component analysis (PCA), based on the mean values of all analyzed growth and biochemical parameters, was performed using the statistical package Stagraphics Centurion, v. XVIII.

### 3. Results

#### 3.1. Physicochemical Characterisation of the Soil

Table 1 shows the physicochemical characterization of the soil collected in the Chinampas area of Xochimilco, Mexico City, according to the NMX-021 norm. The soil has a clay-loam texture, with a high percentage of clay, which implies a low permeability that can favor pesticide accumulation. The soil is also characterized by high total nitrogen and organic matter contents. Nevertheless, the most relevant property, which can adversely affect plant growth, is that the soil is saline, with an electrical conductivity of more than 12 dS m<sup>-1</sup>.

**Table 1.** Physicochemical characterization of the soil collected in the Chinampas area of Xochimilco, Mexico City, according to the Mexican NMX-021 norm. Mean values ± SD (n = 5) are shown for each soil parameter.

Soil Characteristics	Value	Classification NMX-021
pH	7.35 ± 0.76	Neutral
EC (dS m <sup>-1</sup> )	12.8 ± 3.53	Saline soil
Moisture (%)	90.7 ± 5.43	N/A
C organic (%)	12.5 ± 0.15	N/A
Organic matter (%)	21.6 ± 0.25	Very high
Total nitrogen (%)	0.80 ± 0.06	Very high
Phosphorus (mg kg <sup>-1</sup> )	10.7 ± 0.53	High
Sand (%)	33.0 ± 2.28	N/A
Clay (%)	36.2 ± 0.28	N/A
Silt (%)	30.7 ± 2.00	N/A

N/A: not applicable.

Soil samples were also collected from the pot substrates, together with the plant material, at the end of the experiments; that is, after one month of growing the plants in the different tested substrates. The electrical conductivity data, shown in Table 2, indicate that the use of biostimulants had a statistically significant effect, reducing the salinity of the control soil. The same is true for the soil contaminated with endosulfan, which also showed a significantly reduced salinity with respect to the control; however, treatment with *P. crustosum* or the citric waste did not reduce further the electrical conductivity of the contaminated soil (Table 2).

**Table 2.** Electrical conductivity (EC) of the pot substrates after one month of plant growth. Soil sampled in the Chinampas area was used as control (C); soil contaminated with endosulfan (CE); soil bioremediated with *Penicillium crustosum* (CPc); endosulfan-contaminated soil, bioremediated with *P. crustosum* (EPc); soil bioremediated with citric waste (CCW); endosulfan-contaminated soil, bioremediated with citric waste (ECW). Values represent the means of five samples per treatment, followed by SD. Different letters indicate significant differences between treatments, according to the Tukey test, at the 99% confidence level.

Substrate Type	EC (dS m <sup>-1</sup> )
C	11.1 ± 2.88 <sup>c</sup>
CE	10.0 ± 3.40 <sup>b</sup>
CPc	9.23 ± 2.76 <sup>a</sup>
EPc	9.88 ± 3.29 <sup>b</sup>
CCW	9.35 ± 3.03 <sup>a</sup>
ECW	10.2 ± 3.38 <sup>b</sup>

### 3.2. Effect of the Treatments on Plant Growth

*Phaseolus leptostachyus* plants were subjected to six treatments, by growing them in the different types of soil defined above. Seed germination rates were determined and, one month after seedling emergence, the plants were harvested, and several growth parameters were measured (Table 3). Germination percentages were high and not significantly different in the control and the substrates treated with the biostimulants. Contamination of the soil with endosulfan had a negative effect, significantly reducing germination rates from more than 90% in the control to ca. 67%. Bioremediation of the contaminated soil with *P. crustosum* or citric waste restored the germination capacity of the seeds to control percentages. Considering that seed germination is generally the most stress-sensitive phase of the life cycle of plants, and the electrical conductivity of the substrates, these germination percentages close to 100%, show the high salt tolerance of *P. leptostachyus*.

**Table 3.** Effect of soil treatments on plant growth parameters. Soil sampled in the Chinampas area was used as control (C); soil contaminated with endosulfan (CE); control soil bioremediated with *Penicillium crustosum* (CPc); endosulfan-contaminated soil, bioremediated with *P. crustosum* (EPc); control soil bioremediated with citric waste (CCW); endosulfan-contaminated soil, bioremediated with citric waste (ECW). Growth parameters abbreviations: germination rate (GR); root length (RL); stem length (SL); root fresh weight (RFW); stem fresh weight (SFW); leaf fresh weight (LFW); leaf water content (LWC). Values represent the means of five replicas (five individual plants) followed by SD. Different letters in each row indicate significant differences between treatments, according to the Tukey test at the 99% confidence level.

Trait	C	CE	CPc	EPc	CCW	ECW
GR (%)	91.7 ± 15.1 <sup>b</sup>	66.7 ± 13.6 <sup>a</sup>	100.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	100.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	85.0 ± 24.1 <sup>b</sup>	91.7 ± 15.1 <sup>b</sup>
RL (cm)	12.4 ± 2.70 <sup>c</sup>	3.99 ± 0.90 <sup>a</sup>	10.8 ± 1.25 <sup>c</sup>	7.68 ± 1.70 <sup>b</sup>	7.94 ± 1.53 <sup>b</sup>	6.28 ± 1.34 <sup>b</sup>

SL (cm)	36.0 ± 10.5 <sup> a,b</sup>	39.4 ± 6.29 <sup> b</sup>	34.8 ± 3.80 <sup> a,b</sup>	30.8 ± 8.79 <sup> a</sup>	35.9 ± 4.81 <sup> a,b</sup>	39.5 ± 7.98 <sup> b</sup>
RFW (g)	0.11 ± 0.02 <sup> a</sup>	0.14 ± 0.03 <sup> a</sup>	0.43 ± 0.15 <sup> b</sup>	0.12 ± 0.03 <sup> a</sup>	0.51 ± 0.17 <sup> c</sup>	0.14 ± 0.05 <sup> a</sup>
SFW (g)	0.82 ± 0.40 <sup> a,b</sup>	0.94 ± 0.14 <sup> b</sup>	1.16 ± 0.38 <sup> b</sup>	0.88 ± 0.21 <sup> a,b</sup>	1.07 ± 0.20 <sup> b</sup>	0.73 ± 0.22 <sup> a</sup>
LFW (g)	0.80 ± 0.28 <sup> c</sup>	0.50 ± 0.121 <sup> b</sup>	1.43 ± 0.36 <sup> d</sup>	0.38 ± 0.16 <sup> a</sup>	1.41 ± 0.33 <sup> d</sup>	0.50 ± 0.19 <sup> b</sup>
LWC (%)	88.2 ± 4.20 <sup> b</sup>	78.4 ± 3.60 <sup> a</sup>	89.5 ± 0.88 <sup> b</sup>	80.4 ± 3.85 <sup> a</sup>	88.4 ± 1.08 <sup> b</sup>	80.9 ± 3.14 <sup> a</sup>

Plant growth is generally inhibited under salt stress conditions; therefore, it could not be optimal in the saline soil used in our experiments. Still, a stronger negative effect was observed when the plant substrate had been treated with the pesticide, reflected mainly on a considerable reduction of the root length, down to 32% of the control, and a decrease of almost 40% in the leaf FW; endosulfan addition to the substrate also caused a slight, but statistically significant, reduction in leaf water content (Table 3).

The addition of the biostimulants stimulated plant growth in the absence of endosulfan; the most relevant parameters, the FW of roots, stems, and leaves, increased significantly, about 3.9-, 1.3-, and 1.8-fold, respectively, in the presence of *P. crustosum*, and 4.6-, 1.4-, and 1.8-fold in citric waste-treated soil. Contrary to their positive effect on seed germination, remediation with the biostimulants of endosulfan-contaminated soil did not show any substantial effect on plant growth, except for an increase in root length; however, root length did not reach the value of the control not treated with the pesticide. All other growth parameters did not change significantly, or even decreased slightly, by adding *P. crustosum* or the citric waste (Table 3).

### 3.3. Photosynthetic Pigments Contents

Interestingly, all treatments resulted in an increase of Chl a, Chl b, and Caro contents in the plant leaves, with respect to the control soil, with similar qualitative patterns of variation for the three pigments (Table 4). Thus, in soil treated with the biostimulants, foliar Chl a concentration increased about three-fold, Chl b contents 2.7-fold in the presence of *P. crustosum*, and 1.9-fold in the citric waste-remediated soil, whereas carotenoids levels increased ca. 2.3-fold for both biostimulants (Table 4). The increase of the means of pigments concentrations was less pronounced in endosulfan-contaminated soil, between 1.5- and 1.8-fold higher than in non-contaminated soil, but the differences with the corresponding controls were significant only for Chl a. Bioremediation with *P. crustosum* further increased pigment contents, reaching or even exceeding the values measured in non-contaminated soil supplemented with the fungus. On the contrary, bioremediation of endosulfan-contaminated soil with the citric waste did not have any additional effect on photosynthesis pigment levels. The effects of the treatments on the two chlorophylls, a and b, were similar since the ratios Chl a/Chl b did not vary significantly, except for

the saline soil treated with citric waste, which increased compared to the non-bioremediated control (Table 4).

**Table 4.** Effect of soil treatments on photosynthetic pigments contents. Chl a: chlorophyll a, Chl b: chlorophyll b, Caro: total carotenoids. Treatments: Soil sampled in the Chinampas area was used as control (C); soil contaminated with endosulfan (CE); control soil bioremediated with *Penicillium crustosum* (CPc); endosulfan-contaminated soil, bioremediated with *P. crustosum* (EPc); control soil bioremediated with citric waste (CCW); endosulfan-contaminated soil, bioremediated with citric waste (ECW). Values represent the means of five replicas (five individual plants) followed by SD. Different letters in each column indicate significant differences between treatments, according to the Tukey test at the 99% confidence level.

Treatment	Chl a (mg g <sup>-1</sup> DW)	Chl b (mg g <sup>-1</sup> DW)	Ratio Chl a/Chl b	Caro (mg g <sup>-1</sup> DW)
C	7.40 ± 2.36 <sup>a</sup>	2.13 ± 0.74 <sup>a,b</sup>	3.65 ± 1.06 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.26 <sup>a</sup>
CE	13.4 ± 2.05 <sup>b</sup>	3.59 ± 0.45 <sup>a,b</sup>	3.71 ± 0.57 <sup>a</sup>	2.26 ± 0.57 <sup>a</sup>
CPc	22.7 ± 1.93 <sup>c</sup>	5.68 ± 0.59 <sup>c</sup>	4.01 ± 0.18 <sup>a,b</sup>	3.45 ± 0.25 <sup>b</sup>
EPc	25.4 ± 1.99 <sup>c</sup>	6.73 ± 0.89 <sup>c</sup>	3.83 ± 0.61 <sup>a,b</sup>	4.21 ± 0.29 <sup>b</sup>
CCW	22.0 ± 1.75 <sup>c</sup>	4.09 ± 0.88 <sup>b,c</sup>	5.68 ± 1.67 <sup>b</sup>	3.32 ± 0.67 <sup>b</sup>
ECW	14.03 ± 1.90 <sup>b</sup>	3.66 ± 0.29 <sup>a,b</sup>	3.82 ± 0.24 <sup>a</sup>	2.22 ± 0.26 <sup>a</sup>

### 3.4. Osmolyte Quantification

To compensate for the osmotic stress generated by salinity and other stress conditions, plants accumulate different compatible solutes or osmolytes to help cellular osmotic adjustments. Leaf concentrations of proline (Pro) and total soluble sugars (TSS), common plant osmolytes, were determined in plants grown in all selected substrates (Table 5). Pro concentrations decreased to 50–60% of the control in the presence of the biostimulants, whereas endosulfan alone or in combination with *P. crustosum* did not have any significant effect. On the other hand, plants grown in endosulfan-contaminated soil bioremediated with the citric waste showed a reduced Pro level, but not so pronounced as in the corresponding control, the non-contaminated soil with citric waste (Table 5). The mean TSS leaf levels showed only small, in most cases, non-significant changes when comparing the different treatments (Table 5).

**Table 5.** Effect of soil treatments on osmolyte contents. Pro: proline, TSS: total soluble sugars; gluc: glucose, used as the standard in TSS determination. Treatments: Soil sampled in the Chinampas area was used as control (C); soil contaminated with endosulfan (CE); control soil bioremediated with *Penicillium crustosum* (CPc); endosulfan-contaminated soil, bioremediated with *P. crustosum* (EPc); control soil bioremediated with citric waste (CCW); endosulfan-contaminated soil, bioremediated with citric waste (ECW). Values represent the means of five replicas (five individual plants) followed by SD. Different letters in each column indicate significant differences between treatments, according to the Tukey test at the 99% confidence level.

Treatment	Proline (μmol g <sup>-1</sup> DW)	TSS (mg eq. gluc g <sup>-1</sup> DW)
C	18.2 ± 0.58 <sup>c</sup>	1.84 ± 0.10 <sup>a</sup>

CE	18.6 ± 0.52 <sup>c</sup>	2.16 ± 0.34 <sup>a,b</sup>
CPc	8.53 ± 1.27 <sup>a</sup>	1.95 ± 0.18 <sup>a</sup>
EPc	17.4 ± 0.56 <sup>c</sup>	2.34 ± 0.34 <sup>b</sup>
CCW	10.1 ± 0.93 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.21 <sup>a</sup>
ECW	13.6 ± 0.44 <sup>b</sup>	1.95 ± 0.17 <sup>a</sup>

### 3.5. Oxidative Stress Markers and Total Phenolic Compounds

Malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) leaf contents were determined to evaluate the degree of oxidative stress affecting the plants after the different treatments; total phenolic compounds (TPC) were also quantified as representative non-enzymatic antioxidants (Table 6). The highest concentrations of MDA were measured in plants grown in the control and endosulfan-contaminated soils. Treatment with the biostimulants significantly reduced MDA levels, especially in the presence of the pesticide; the lowest value, of about 25% of the control, was observed in endosulfan-contaminated soil bioremediated with citric waste (Table 6). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, on the other hand, did not vary significantly after the different treatments, except for a small increase in endosulfan-contaminated soil bioremediated with *P. crustosum*. TFC contents showed a somewhat different pattern; a significant decrease was observed in the citric waste treatment (with and without endosulfan) but not in the *P. crustosum* treatments; as for MDA, endosulfan addition to the control soil did not affect the concentration of these compounds (Table 6).

**Table 6.** Effect of soil treatments on oxidative stress markers and non-enzymatic antioxidants. MDA: malondialdehyde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hydrogen peroxide, TPC: total phenolic compounds; GA: gallic acid, used as the standard in TPC determination. Treatments: Soil sampled in the Chinampa area was used as control (C); soil contaminated with endosulfan (CE); control soil bioremediated with *Penicillium crustosum* (CPc); endosulfan-contaminated soil, bioremediated with *P. crustosum* (EPc); control soil bioremediated with citric waste (CCW); endosulfan-contaminated soil, bioremediated with citric waste (ECW). Values represent the means of five replicas (five individual plants) followed by SD. Different letters in each column indicate significant differences between treatments, according to the Tukey test at the 99% confidence level.

Treatment	MDA (nmol g <sup>-1</sup> DW)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol g <sup>-1</sup> DW)	TPC (mg eq. GA g <sup>-1</sup> DW)
C	656.5 ± 58.4 <sup>d</sup>	362.4 ± 31.5 <sup>a</sup>	21.1 ± 2.68 <sup>b</sup>
CE	704.8 ± 54.5 <sup>d</sup>	395.8 ± 35.9 <sup>a,b</sup>	19.6 ± 2.71 <sup>b</sup>
CPc	460.4 ± 64.8 <sup>b,c</sup>	399.2 ± 17.0 <sup>a,b</sup>	19.5 ± 1.91 <sup>b</sup>
EPc	328.3 ± 64.8 <sup>b</sup>	467.2 ± 52.1 <sup>b</sup>	19.0 ± 2.71 <sup>b</sup>
CCW	476.8 ± 37.4 <sup>c</sup>	331.7 ± 15.8 <sup>a</sup>	11.6 ± 1.75 <sup>a</sup>
ECW	165.1 ± 13.7 <sup>a</sup>	333.6 ± 25.7 <sup>a</sup>	13.3 ± 2.24 <sup>b</sup>

### 3.6. Activity of Antioxidant Enzymes

To counteract the oxidative stress generated, as a secondary effect, by high soil salinity and other stress conditions, plants activate their antioxidant enzymatic machinery. The specific activities of four

relevant antioxidant enzymes—superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and glutathione reductase (GR)—were determined in *P. leptostachyus* plants after concluding the different treatments (Table 7). The activity of the four enzymes was highest in the control saline soil in relation to most other treatments. Bioremediation of this substrate with *P. crustosum* resulted in a significant reduction of all activities, whereas the citric waste had the same effect on GR but did not affect SOD, CAT, and APX activities (Table 7). Endosulfan treatment caused a significant decrease in CAT, APX, and GR specific activities; however, SOD activity was not significantly different from the control value. The treatment with the biostimulants of endosulfan-contaminated substrates, in general, decreased further SOD, CAT, and APX mean activities, with respect to the corresponding controls, although the observed differences were not always statistically significant; on the contrary, GR activity increased when the endosulfan-treated soil was bioremediated with *P. crustosum* or citric waste (Table 7).

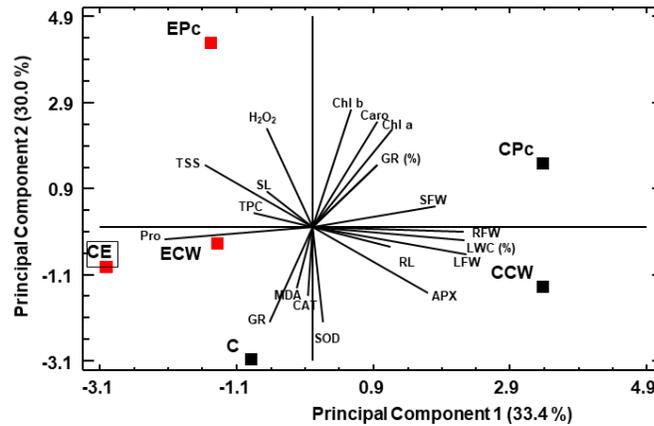
**Table 7.** Effect of soil treatments on the specific activity of antioxidant enzymes expressed in units  $\text{mg}^{-1}$  protein. SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; APX: aspartate peroxidase; GR: glutathione reductase. Treatments: Soil sampled in the Chinampas area was used as control (C); soil contaminated with endosulfan (CE); control soil bioremediated with *Penicillium crustosum* (CPc); endosulfan-contaminated soil, bioremediated with *P. crustosum* (EPc); control soil bioremediated with citric waste (CCW); endosulfan-contaminated soil, bioremediated with citric waste (ECW). Values represent the means of five replicas (five individual plants) followed by SD. Different letters in each column indicate significant differences between treatments, according to the Tukey test at the 99% confidence level.

Treatment	SOD (U $\text{mg}^{-1}$ prot)	CAT (U $\text{mg}^{-1}$ prot)	APX (U $\text{mg}^{-1}$ prot)	GR (U $\text{mg}^{-1}$ prot)
C	36.9 ± 7.87 <sup>c</sup>	10.6 ± 1.59 <sup>b</sup>	0.13 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.89 ± 0.27 <sup>e</sup>
CE	46.5 ± 3.53 <sup>c</sup>	6.77 ± 1.41 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.47 ± 0.13 <sup>b,c</sup>
CPc	26.7 ± 4.74 <sup>b</sup>	6.05 ± 1.04 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.20 ± 0.24 <sup>a</sup>
EPc	15.3 ± 1.99 <sup>a</sup>	7.34 ± 1.16 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.18 ± 0.05 <sup>ab</sup>
CCW	44.4 ± 4.08 <sup>c</sup>	8.33 ± 1.33 <sup>ab</sup>	0.13 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.67 ± 0.18 <sup>c</sup>
ECW	24.1 ± 4.24 <sup>b</sup>	6.21 ± 0.61 <sup>a</sup>	0.04 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.19 ± 0.11 <sup>d</sup>

### 3.7. Principal Component Analysis

A principal component analysis (PCA) was performed, based on the means of all determined growth and biochemical parameters (Figure 1). Five components with Eigenvalues higher than one were detected, covering together 100% of the total variability. The first component explained 33.4% of the variability and showed highly significant positive correlations with the most relevant growth parameters, the fresh weight of leaves (LFW), stems (SFW), and roots (RFW) and leaf water content (%WC) and was negatively correlated mainly with the concentration of proline (Pro). These data agreed with the observation that Pro concentration was higher under conditions causing plant growth inhibition. The second component, explaining an

additional 30.0% of the total variability, correlated with the variables related to oxidative stress and antioxidant systems, particularly (and negatively) with MDA levels and the activities of the assayed antioxidant enzymes. The applied treatments were separated along the first component axis. The control (saline) soil appears in the negative part of the graph, in agreement with the fact that soil salinity causes inhibition of growth. However, treatment with the biostimulants, *P. crustosum*, and citric waste, stimulates plant growth and, consequently, the CPc and CCW variables localized in the positive part of the axis. The strong negative correlation of the endosulfan-contaminated substrate (CE) with the growth parameters supports the adverse effect of the pesticide on plant growth, an effect that is not compensated by the biostimulants. Nevertheless, there are differences between the two biostimulants, which are clearly separated with respect to the second axis of the figure, both in the presence and the absence of endosulfan (Figure 1).



**Figure 1.** Principal component analysis (PCA). Changes in growth and biochemical parameters in plants grown on soil sampled in the Chinampas area used as control (C); soil contaminated with endosulfan (CE); control soil bioremediated with *Penicillium crustosum* (CPc); endosulfan-contaminated soil, bioremediated with *P. crustosum* (EPC); control soil bioremediated with citric waste (CCW); endosulfan-contaminated soil, bioremediated with citric waste (ECW). The percentages of the total variability explained by the first two components are shown (in parentheses) on the X and Y axes, respectively. Red squares correspond to treatments including endosulfan. Abbreviations: GR (%), germination rate; RL, root length; RFW, root fresh weight; SL, stem length; SFW, stem fresh weight; LFW, leaf fresh weight; LWC (%), leaf water content; Chl a, chlorophyll a; Chl b, chlorophyll b; Caro, carotenoids; Pro, proline; TSS, total soluble sugars; MDA, malondialdehyde; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hydrogen peroxide; TPC, total phenolic compounds; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; APX, aspartate peroxidase; GR, glutathione reductase.

#### 4. Discussion

The physicochemical characteristics of the Chinampas soils are related to their genesis and evolution in time. These soils were

generated by the accumulation of organic matter, loamy lacustrine sediments, or other materials used to consolidate the elevated platforms, separated by a system of canals [6,49]. At present, the use of the Chinampas zone for agriculture faces a severe problem of soil salinization, although there are large variations between different sites within this area. Pedologic analyses could not correlate salinity to the clay or organic matter content of the soil, so it was considered that the main reasons for salts accumulation were water evaporation in the canals, the use of urban wastewater to compensate for the reduced water level, illegal settlements, and the conversion of agricultural lands into urban areas [6,50]. The soil samples used in this work as the substrate for *P. leptostachyus* plants grown in pots, as control or for the different treatments—with the pesticide endosulfan and biostimulants—were moderately saline with a clay-loam texture and a high content in organic matter. Increased organic matter content is frequent in Chinampas soils and is related to the accumulation of the organic-rich materials, raised during the excavation of canals and enhanced due to manuring and warping, or related to natural humification processes [49,51].

The present findings indicate that *P. leptostachyus* is tolerant to salinity, mainly shown by its high seed germination capacity, close to 100%, on soil with salinity as high as  $12 \text{ dS m}^{-1}$ , as has been previously reported by Bayuelo-Jiménez et al. [22]. Seed germination itself, morphological parameters of plants grown in the same substrate and the relative levels of several biochemical stress markers were determined to evaluate the effects of endosulfan and the biostimulants on plant development.

Regarding endosulfan, initial reports indicated that this pesticide is “very plant tolerant”, producing little damage to the plants and having little effect on mineral tissue composition and yields of different crops [52]. However, more recent studies revealed its high phytotoxic effects, even at lower concentrations, on seed germination, plant growth, and nutrients uptake [53–57], and its adverse effects on soil and water biota [58–61] and human health [14,62]. In the present study, the deleterious effects of the pesticide were most clearly shown by the substantial inhibition of seed germination. This stage represents the bottleneck in the biological cycle of plants, being generally the most susceptible to environmental stressors, including pesticides [57]. Both tested biostimulants, *P. crustosum* and the citric waste, completely restored the germination capacity of the seeds to control percentages. The addition of endosulfan to the substrate also inhibited the growth of young plants, as reflected in the considerable reduction of root length and a significant drop in leaf FW and water content, and also in the results of the PCA, where the endosulfan treatment is strongly and negatively correlated with the growth parameters. The pesticide inhibitory effect would most likely have been more clearly observed in plants cultivated in non-saline soils since the salinity of the control substrate must also negatively affect plant growth in the absence of endosulfan. Treatment of the substrate with *P. crustosum* or the citric waste stimulated plant growth compared to the control, whereas the

biostimulants did not have any relevant effect on endosulfan-contaminated soil.

Degradation of photosynthetic pigments is a typical response to salt stress and many other stressful conditions [63–65], also reported in common beans [66]. In our experiments, after all the applied treatments, the plants grown in the control substrate showed the lowest pigment contents, followed by those treated with endosulfan. In the absence of the pesticide, both biostimulants induced a two- to three-fold increase in the concentrations of the three pigments, indicating that previous bioremediation of the substrate with the fungus or the citric waste partly counteracted the negative effects of soil salinity on the *P. leptostachyus* plants. In endosulfan-contaminated substrates, however, only the fungus had a significant effect, increasing the three pigments contents between 1.8- and 2-fold.

Proline is one of the most common osmolytes in plants, accumulating under different environmental conditions that induce osmotic stress, such as drought and salinity [67–69]. Apart from its role in osmotic adjustment, Pro is involved in antioxidant mechanisms, acting as a free radical scavenger and contributing to cellular redox balance [70]. Furthermore, Pro can be considered a low-molecular-weight chaperon, which directly stabilizes proteins and macromolecular structures, and is also a signaling molecule [68]. In common beans, Pro is a reliable stress biomarker, accumulating in direct proportion to the level of stress affecting the plants; that is, under the same stressful conditions, higher Pro concentrations are generally measured in the more sensitive genotypes [71–74]; this seems to be also the case in *P. leptostachyus*, according to the results of the PCA, where Pro levels are negatively correlated to plant growth parameters. In our experiments, the plants grown in the control soil, with and without endosulfan, appeared to be the most stressed as they showed the highest leaf Pro contents. In the absence of the pesticide, pre-treatments of the substrate with both biostimulants had a clear effect, reducing the concentration of Pro and, therefore, the degree of stress affecting the plants after one month of growth. In the pots with endosulfan-contaminated substrates, bioremediation with the citric waste had the same effect, reducing Pro contents with respect to the corresponding control; addition of *P. crustosum*, on the contrary, did not induce any significant change in foliar Pro levels.

Soluble sugars may also play a significant role in osmotic adjustment under stress conditions. Stress-induced changes in the leaf concentration of TSS or some specific carbohydrates, such as glucose and *myo*-inositol, have been reported in common beans [71,75]. However, soluble carbohydrates are the direct product of photosynthesis, energy sources, precursors in different metabolic pathways and signaling molecules involved in many biological processes, making it difficult to assess their participation in specific stress response mechanisms [76,77]. In the present study, in general, TSS levels did not change significantly in the different treatments, suggesting that these compounds are not involved in the plants' reactions to endosulfan and biostimulants.

Under different stress conditions, all organisms increase the production of reactive oxygen species (ROS), including several free radicals and molecules such as  $O_2$ ,  $O_3$ , or  $H_2O_2$ . ROS are bio-products of aerial metabolism and play an essential function as secondary signaling messengers in many physiological processes. However, when produced in excess, they become toxic and negatively affect cell metabolism, even causing cell death at high concentrations [78,79]. Malondialdehyde (MDA), a product of membrane lipid peroxidation [80], is widely used as a biochemical marker to estimate the level of oxidative stress experienced by the plants under specific conditions and their degree of sensitivity to a particular type of stress [81,82]. MDA levels were highest, and not significantly different, in plants grown for one month in control and endosulfan-contaminated soils. In both cases, bioremediation with *P. crustosum* or citric waste induced a significant decrease in MDA concentrations and, consequently, a reduction in the degree of oxidative stress. Hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ , formed by the dismutation of the superoxide radical, is a moderately reactive molecule that is also used as a marker of oxidative stress [83,84]. However,  $H_2O_2$  measurements should be considered with caution because it is a relatively unstable compound and is involved in a wide variety of reactions and stress signaling cascades, which could mask its direct involvement in cellular redox balance [85,86]. In the present experimental conditions,  $H_2O_2$  concentrations did not differ between the control and the endosulfan-contaminated soil and decreased, in both cases, by bioremediation with the citric waste. These results showed that the biostimulant caused a reduction in the levels of oxidative stress in the plants, as compared to the non-treated substrate, as was also indicated by the decrease in MDA levels. However, contrary to what was expected, treatment of the soil with *P. crustosum* did not alter  $H_2O_2$  contents, either in control soil or in the presence of the pesticide. This contradiction may be explained by the ability of fungi of the genus *Penicillium* to generate free radicals, used to oxidize different types of xenobiotics [87], thus maintaining ROS levels in the plants. Changes in total phenolic compounds (TPC) contents followed the same pattern that those of  $H_2O_2$ , with higher and not significantly different values in plants grown in control and *P. crustosum*-treated soils, with and without endosulfan; significantly lower TPC concentrations were determined in the citric waste treatments. There is, therefore, a positive correlation between the level of oxidative stress affecting the plants in the different substrates and the accumulation of this group of antioxidant compounds.

Concerning the specific activities of antioxidant enzymes in the different treatments, a general positive correlation between the level of oxidative stress and the enzymatic activities was observed. Thus, for all four enzymes, the highest activities were measured in plants grown in the control saline soil and decreased significantly in the *P. crustosum*-bioremediated substrates; however, except for GR, this effect was not observed in the soils treated with citric waste. Regarding the endosulfan-contaminated substrates, no clear pattern could be established for the variation of enzyme activities as qualitative and

quantitative differences were observed, depending on both the enzymes and the treatments.

It should be remarked that the determination of the biochemical parameters was carried out after one month of growth on the different substrates, when plants were already acclimated to the diverse experimental conditions. Therefore, the lower TPC contents and antioxidant enzyme activities in the bioremediated soils simply reflect a lower degree of oxidative stress in those plants, as compared to the controls. It is likely that different patterns of antioxidant activities, with higher levels in the bioremediated soils, would have been initially observed. However, we did not harvest the plant material at shorter times of growth since under those conditions, no differences in growth parameters between treatments could be detected, to be correlated with possible changes in the biochemical variables.

## 5. Conclusions

The 'Chinampas' zone of Xochimilco, in Mexico City, represents a unique, sustainable agroecosystem, worth to be maintained and protected for cultural, economic, and environmental reasons. The productivity of crops cultivated in this area is affected by the salinity of the soil and, presumably, also by the excessive use of agrochemicals, such as the organochlorine pesticide endosulfan. In the present study, we show that soil salinity negatively affects the growth of *Phaseolus leptostachyus* plants and that bioremediation of the saline soil with the fungus *Penicillium crustosum* or a citric waste stimulates plant growth. This stimulation effect, assessed after one month of growth in the different substrates, appear to be due, at least in part, to a reduction of the salt-induced oxidative stress in the plants, as shown by a general decrease in the levels of biochemical stress markers (Pro, MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which was accompanied by a reduction in the activity of antioxidant compounds and enzymatic systems. The two biostimulants, however, seemed to exert their effects through different mechanisms. In the case of the fungus, the lower oxidative stress degree was associated with a reduction in the specific activities of antioxidant enzymes, whereas the levels of antioxidant phenolic compounds did not vary. The opposite is true for remediation with the citric waste, where reduced oxidative stress was marked by a less pronounced accumulation of phenolic compounds, whereas enzymes activities (except for GR) were not affected. Further studies performed in the field on a larger scale and including the reproductive phase will be needed to demonstrate that the biostimulants also improve crop yields. In any case, despite the relative salt tolerance of *P. leptostachyus*, the use of biostimulants is recommended to cultivate this species in the Chinampas, to partly compensate for the adverse effects of soil salinity on plant growth.

Soil contamination with endosulfan inhibited seed germination and further decreased plant growth with respect to the control saline soil. Both biostimulants increased germination percentages to control values, close to 100%, but their effects on plant growth and the assayed biochemical parameters did not follow a clear pattern, probably because they were masked by the salt stress simultaneously affecting

the plants. Even if the application of this pesticide, already banned in many other countries, is stopped, the organochlorine compounds and/or their derivatives, all toxic, will remain in the soil for a long time. Therefore, soil remediation with biostimulants is also recommended to improve seed germination and plant growth in endosulfan-contaminated soils.

**Author Contributions:** Conceptualization, R.R.-V. and O.V.; methodology, A.L.-F. and S.G.-O.; software, M.B.; validation, R.R.-V., M.B. and O.V.; formal analysis, A.L.-F. and S.G.-O.; investigation, A.L.-F. and S.G.-O.; resources, R.R.-V. and O.V.; data curation, A.L.-F.; writing—original draft preparation, A.L.-F. and M.B.; writing—review and editing, O.V.; visualization, M.B.; supervision, R.R.-V. and O.V.; project administration, O.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Acknowledgments:** Anbu Landa-Faz is grateful to CONACYT, Mexico for receiving the Ph.D. Scholarship no 306251.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Robles, B.; Flores, J.; Martínez, J.; Herrera, P. The Chinampa: An ancient Mexican subirrigation system. *Irrig. Drain.* **2018**, *68*, 115–122. <https://doi.org/10.1002/ird.2310>.
2. Ebel, R. Chinampas: An urban farming model of the Aztecs and a potential solution for modern Megalopolis. *HortTechnology* **2020**, *30* (1), 13–19. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH04310-19>.
3. Rosas, I.B.; Baez, A.; Coutiño, M. Bacteriological quality of crops irrigated with wastewater in the Xochimilco plots, México City, México. *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, *47* (5), 1074–1079.
4. Vallejo, A.C.; Aguilera, N. Diagnóstico de los índices de contaminación de algunas calicatas de Suelos de Chinampa de San Gregorio Atlapulco, D.F. In *III Reunión Nacional de Halófitas y Manejo de Aguas y Suelos Salinos*, Llerena, V.F.A., Hernández, F.L., Jacobo, T.C., Sánchez, B. B., SARH y Comisión Nacional del Agua; México. D.F., 1994, 114–122.
5. Lot, A.; Novelo, A.; Quiroz, A. The chinampa: An agricultural system that uses aquatic plants. *J. Aquat. Plant. Manag.* **1979**, *17*, 174–175.
6. Ramos Bello, R.; García Calderón, N.E.; Ortega Escobar, H.M.; Krasilnikov, P. Artificial chinampas soils of Mexico city; their properties and salinization hazards. *Span. J. Soil. Sci.* **2011**, *1*, 71–85.
7. Ivushkin, K.; Bartholomeus, H.; Bregt, A.; Pulatov, A.; Kempen, B.; De Sussa, L. Global mapping of soil salinity change. *Remote Sens. Environ.* **2019**, *231*, 111260. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2019.111260>.
8. Azapagic, A.; Hassani, A.; Shokri, N. Predicting long-term dynamics of soil salinity and sodicity on a global scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117* (52), 33017–33027. <https://doi.org/10.1073/pnas.2013771117>
9. Munns, R.; Gillihan, M. Salinity tolerance of crops – what is the cost?. *New. Phytol.* **2015**, *208*, 668–673, <https://doi.org/10.1111/nph.13519>.
10. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Anuario estadístico de producción agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Accessed on 5<sup>th</sup> of February, 2021).
11. Parihar, P.; Singh, S.; Singh, R.; Singh, V.P.S.; Prasad, M. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 4056–4075. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3739-1>.
12. Rodríguez, V.R.; Rodríguez, B.M. Bioremediation of the chinampa soil located in Cuemanco, Xochimilco, D.F, contaminated with pesticides using *Penicillium* sp. *Biotua* **2019**, *17* (1), 48–58.
13. Carvalho, F. P.; Nhan, D. D.; Zhong, C.; Tavares, T.; Klaine, S. Rastreo de plaguicidas en los trópicos: Resultados de un proyecto internacional de investigación. Boletín del OIEA. [https://www.iaea.org/sites/default/files/40305692430\\_es.pdf](https://www.iaea.org/sites/default/files/40305692430_es.pdf) (Accessed on 21<sup>th</sup> of March, 2021)

14. Sebastian, R.; Raghavan, S.C. Molecular mechanism of endosulfan action in mammals. *J. Biosci.* **2017**, *42*, 149–153. <https://doi.org/10.1007/s12038-016-9655-4>.
15. Vázquez-Villegas, P.T.; Meza-Gordillo, R.; Luján-Hidalgo, M.C.; Cruz-Salomón, A.; Ruíz-Valdiviezo, V.M.; Gutiérrez-Miceli, F.A.; Villalobos-Maldonado, J.J.; Montes-Molina, J.A. Optimization and validation of an extraction method for endosulfan lactone on a solid substrate. *Processes* **2021**, *9*, 284. <https://doi.org/10.3390/pr9020284>.
16. Sharma, A.; Kumar, V.; Shahzad, B.; Tanveer, M.; Sidhu, G.P.S.; Handa, N.; Kohli, S.K.; Yadav, P.; Bali, A.S.; Parihar, R.D.; Dar, O.I.; Singh, K.; Jasrotia, S.; Bakshi, P.; Ramakrishnan, M.; Kumar, S.; Bhardwaj, R.; Thukral, A.K. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl. Sci.* **2019**, *1*, 1446. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>.
17. Gupta, P.K.; Gupta, R.C. Pharmacology, toxicology and degradation of endosulfan A review. *Toxicology* **1979**, *13*, 115–130.
18. Menezes, R.G.; Qadir, T.F.; Moin, A.; Fatima, H.; Hussain, S.A.; Madadin, M.; Pasha, S.B.; Al Rubaish, F.A.; Senthilkumaran, S. Endosulfan poisoning: An overview. *J. Forensic Leg. Med.* **2017**, *51*, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.07.008>.
19. Stamatiou-Sanchez, K.; Alarcón, A.; Ferrera-Cerrato, R.; Nava-Diaz, C.; Sánchez-Escudero, J.; Cruz-Sánchez, J. S.; Castillo, M. D. P. Tolerancia de hongos filamentosos a endosulfán, clorpirifós y clorotalonil en condiciones in vitro. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* **2015**, *31* (1), 23–37.
20. Ferraz, M.E.; Fonsêca, A.; Pedrosa-Harand, A. Multiple and independent rearrangements revealed by comparative cytogenetic mapping in the dysploid *Leptostachyus* group (*Phaseolus L.*, Leguminosae). *Chromosome Res.* **2020**, *28*, 395–405. <https://doi.org/10.1007/s10577-020-09644-z>.
21. Debouck, D.; Chaves-Barrantes, N.; Araya-Villalobos, R. New records of *Phaseolus Microcarpus* (Leguminosae: *Phaseoleae*) For Costa Rica. *J. Bot. Res. Inst. Tex.* **2019**, *13* (1), 209–215. <https://www.jstor.org/stable/26783983>.
22. Bayuelo-Jiménez, J.S.; Craig, R.; Lynch, J.P. Salinity tolerance of *Phaseolus* species during germination and early seedling growth. *Crop. Sci.* **2002**, *42*, 1584–1594. <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.1584>.
23. Acosta-Díaz, E.; Hernández-Torres, I.; Amador-Ramírez, M.D.; Padilla-Ramírez, J.S.; Zavala-García, F. The wild species of *Phaseolus (Fabaceae)* in Nuevo León, Mexico. *REMEXCA* **2014**, *8*, 1459–1465.
24. Dohle, S.; Berny Mier y Teran, J.C.; Egan, A.; Kisha, T.; Khoury, C.K. Wild Beans (*Phaseolus L.*) of North America. In *North American Crop Wild Relatives*; Greene, S.L., Williams, K.A., Khoury, C.K., Kantar, M.B., Marek, L.F., Springer, 2019. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-97121-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-97121-6_4).
25. Watson, C.; Reckling, M.; Preissel, S.; Bachinger, J.; Bergkvist, G.; Kuhlman, T.; Lindström, K.; Nemecek, T.; Topp, C.; Vanhatalo, A.; Zander, Z.; Murphy-Bokern, D.; Stoddard, F. Grain legume production and use in European agricultural systems. *Adv. Agron.* **2017**, *144* (1), 235–303. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2017.03.003>.
26. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). Panorama Agroalimentario. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. Frijol 2019. <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2020/01/Panorama-Agroalimentario-Frijol-2019.pdf> (Accessed on April, 2021).
27. Parida, A.K.; Das, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2005**, *60*, 324–349. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010>.
28. Munns, R.; Tester, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **2008**, *59*, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>.
29. Maas, E.V.; Hoffman, G.J. Crop salt tolerance-current assessment. *J. Irrig. Drain. Eng.* **1977**, *103*, 115–134. <https://doi.org/10.1061/JRCEA4.0001137>.
30. De Pascale, S.; Barbieri, G.; Ruggiero, C. Effects of water salinity on plant growth and water relations in snap bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Acta Hortic.* **1997**, *449*, 649–656. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.449.90>.
31. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) Norma Mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/DO2280n.pdf> (Accessed on 20<sup>th</sup> of April, 2020).

32. Bouyoucos, G.J. Directions for Making Mechanical Analysis of Soils by the Hydrometer Method. *Soil Sci.* **1936**, *42*, 225-228.
33. Escobar-Flores N. Remediación de suelos agrícolas salinos con un inóculo fúngico y su evaluación como biofertilizante. Master thesis. Master of Biotechnology and Bioengineering, CINVESTAV, Mexico. November 2020.
34. Cantu-Soto, E.U., Meza-Montenegro, M.M., Valenzuela-Quintanar, Félix-Fuentes, A., Grajeda-Cota, P., Balderas-Cortes, J.J., Osorio-Rosas, C.L., Acuña-García, G., Aguilar-Apodaca, M.G., Residues of Organochlorine Pesticides in Soils from the Southern Sonora, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2011**, *87*, 556-560. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0353-5>
35. Landa-Faz A., Rodríguez-Vázquez R., Roldán-Carrillo T.G, Hidalgo-Lara M.E., Aguilar-López R, Cebrián-García M.E. Bioremediation of an agricultural saline soil contaminated with endosulfan and *Escherichia coli* by an active surface agent induced in a *Penicillium crustosum* culture. *Prep Biochem Biotechnol.* (In Press).
36. Lichtenthaler, H.K.; Wellburn, A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* **1983**, *11*, 591-592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>.
37. Bates, L.S.; Waldren, R.P.; Teare, I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* **1973**, *39*, 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>.
38. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Reberd, P.A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
39. Hodges, D.M.; DeLong, J.M.; Forney, C.F.; Prange, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **1999**, *207*, 604-611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>.
40. Taulavuori, E.; Hellström, E.K.; Taulavuori, K.; Laine, K. Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. *J. Exp. Bot.* **2001**, *52* (365), 2375-2380. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.365.2375>.
41. Loreto, F.; Velikova, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant. Physiol.* **2001**, *127*(4), 1781-1787. <https://doi.org/10.1104/pp.010497>.
42. Blainski, A.; Lopes, G.C. ; de Mello, J.C.P. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* **2013**, *18*, 6852-6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>.
43. Gil, R.; Bautista, I.; Boscaiu, M.; Lidón, A.; Wankhade, S.; Sánchez, H.; Llinares, J.; Vicente, O. Responses of five Mediterranean halophytes to seasonal changes in environmental conditions. *AoB Plants* **2014**, *6*, 1-18. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plu049>.
44. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
45. Beyer, W.; Fridovich, I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* **1987**, *161*, 559-566. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1).
46. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
47. Nakano, Y.; Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **1981**, *22*, 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>.
48. Connell, J.P.; Mullet, J.E. Pea chloroplast glutathione reductase: purification and characterization. *Plant Physiol.* **1986**, *82*, 351-356. <https://doi.org/10.1104/pp.82.2.351>.
49. Jiménez, J.J.; Rojas, R.T.; Del Amo, S.; Gomez Pompa, A. Conclusiones y recomendaciones del taller. In *Pasado y Futuro de las Chinampas*. Rojas, R.T. CIESAS, Patronato del Parque Ecológico de Xochimilco. México. D.F., 1995, 1852.
50. Ramos, B.R.; Cajuste, J.L.; Flores, R.D.; García, C.N.E. Heavy metals, salts, and sodium in chinampa soils in México. *Agrociencia* **2001**, *35*, 385-395.

51. García, C.N.; Galicia, P.S.; Aguilera, H.N.; Reyes, O.L. Organic matter and humic substances contents in chinampa soils from Xochimilco Tláhuac areas (Mexico). In *Proceedings of the 15th World Congress of Soil Science*, Acapulco, Mexico, 1994; vol. 3: Symposium ID12. p. 368-383.
52. Warman, P.R.; Fairchild, G. The effects of endosulfan and fertilizer source on soil fertility. *Plant Soil* **1983**, *74*, 189–202. <https://doi.org/10.1007/BF02143609>.
53. Khan, S.; Khan, J.; Jabin, S. Effect of endosulfan on the seed germination, growth and nutrients uptake of fenugreek plant. *J. Ind. Pollut. Control.* **2000**, *16*, 225–230.
54. Fatiha, C.; Fouad, S. Endosulfan induced alterations in physiological responses in *Lycopersicum esculentum* seeds during germination. *Afr. J. Agric. Res.* **2011**, *6* (31). <https://doi.org/10.5897/AJAR11.663>.
55. Veeraswamy, J.; Padmavathi, T.; Venkateswarlu, K. Effect of selected insecticides on plant growth and mycorrhizal development in sorghum. *Agric. Ecosyst. Environ.* **1993**, *43*, 337–343.
56. Mitton, F.M.; Gonzalez, M.; Monserrat, J.M.; Miglioranza, K.S. Potential use of edible crops in the phytoremediation of endosulfan residues in soil. *Chemosphere* **2016**, *148*, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.028>.
57. Pereira, R.C.; Monterroso, C.; Macías, F. Phytotoxicity of hexachlorocyclohexane: Effect on germination and early growth of different plant species. *Chemosphere* **2010**, *79* (3), 326-333. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.01.035>.
58. Pereira, J.L.; Picanço, M.C.; Silva, A.A.; Santos, E.A.; Tomé, H.V.V.; Olarte, J.B. Effects of glyphosate and endosulfan on soil microorganisms in soybean crop. *Planta Daninha* **2008**, *26* (4), 825-830. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582008000400014>.
59. Sun, X.; Zhu, L.; Wang, J.; Su, B.; Du, Z.; Guo, P. Effects of endosulfan on the populations of cultivable microorganisms and the diversity of bacterial community structure in brunisolic soil. *Water Air Soil Pollut.* **2017**, *228*, 169. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3357-x>
60. Mosleh, Y.Y.; Paris-Palacios, S.; Couderchet, M.; Vernet, G. Acute and sublethal effects of two insecticides on earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) under laboratory conditions. *Environ Toxicol.* **2003**, *18*, 1–8. <https://doi.org/10.1002/tox.10095>. PMID: 12539138.
61. Preudhomme, V.; Milla, S.; Gillardin, V.; De Pauw, E.; Denoël, M.; Kestemont, P. Effects of low dose endosulfan exposure on brain neurotransmitter levels in the African clawed frog *Xenopus laevis*. *Chemosphere* **2015**, *120*, 357–364. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.07.096.
62. James, A.; Emmanuel, D. An overview of endosulfan and the aftermath of its biohazardous administration in Southern India. *Eur.J. Mol. Clin. Med.* **2021**, *8*, 212–218.
63. Zengin, F. K.; Munzuroglu, O. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biol. Cracov. Bot.* **2005**, *47* (2), 157–164.
64. Flexas, J.; Medrano, H. Drought inhibition of photosynthesis in C<sub>3</sub> plants: stomatal and non-stomatal limitations revised. *Ann. Bot.* **2002**, *89*, 183–189. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf027>.
65. Munné Bosch, S.; Allegre, I. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Funct. Plant Biol.* **2004**, *31*, 203–216. <https://doi.org/10.1071/FP03236>.
66. Stoeva, N.; Kaymakanova, M. Effect of salt stress on the growth and photosynthesis rate of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Cent. Eur. Agric.* **2008**, *9*(3), 385–391.
67. Kishor, P.B.K.; Sangam, S.; Amrutha, R.N.; Laxmi, P.S.; Naidu, K.R.; Rao, K.R.S.S.; Rao, S.; Reddy K. J.; Theriappan, P.; Sreenivasulu, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.* **2005**, *88*, 424–438. <http://www.jstor.org/stable/24110209>.
68. Szabados, L.; Savouré, A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant. Sci.* **2010**, *15* (2), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>.
69. Kishor, P.B.K.; Sreenivasulu, N. Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? *Plant Cell Environ.* **2014**, *37*, 300–311. Doi: 10.1111/pce.12157. Epub 2013 Jul 24. PMID: 23790054.
70. Kaul, S.; Sharma, S.S.; Mehta, I.K. Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays. *Amino. Acids* **2008**, *34*(2), 315–320. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0407-x>.
71. Al Hassan, M.; Morosan, M.; López-Gresa, M.D.P.; Prohens, J.; Vicente, O.; Boscaiu, M. Salinity-induced variation in biochemical markers provides insight into the mechanisms of salt tolerance in

- common (*Phaseolus vulgaris*) and runner (*P. coccineus*) beans. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1582. <https://doi.org/10.3390/ijms17091582>
72. Arteaga, S.; Yabor, L.; Díez, M.J.; Prohens, J.; Boscaiu, M.; Vicente, O. The use of proline in screening for tolerance to drought and salinity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Agronomy* **2020**, *10*, 817. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060817>
  73. Arteaga, S.; Boscaiu, M.; Prohens, J.; Vicente, O. Role of active transport of potassium to leaves in the mechanisms of tolerance to salinity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Not. Sci. Biol.* **2020**, *12* (2), 447–459. <https://doi.org/10.15835/nsb12210751>
  74. Morosan, M.; Al Hassan, M.; Naranjo, M.A.; López-Gresa, M.P.; Boscaiu, M.; Vicente, O. Comparative analysis of drought responses in *Phaseolus vulgaris* (common bean) and *P. coccineus* (runner bean) cultivars. *Eurobiotech J.* **2017**, *1*, 247–252. <https://doi.org/10.24190/ISSN2564-615X/2017/03.09>
  75. Bahena-Betancourt, L.; Macias-Rodríguez, L.; Bayuelo-Jiménez, J.S. Contents of Carbohydrates in Salt-Stressed *Phaseolus* Species. In *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*. United States Department of Agriculture: Fort Collins, CO, USA, 2006, 233–234.
  76. Krasensky, J.; Jonak, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 1593–1608. <https://doi.org/10.1093/jxb/err460>
  77. Gil, R.; Boscaiu, M.; Lull, C.; Bautista, I.; Lidón, A.; Vicente, O. Are soluble carbohydrates ecologically relevant for salt tolerance in halophytes? *Func. Plant. Biol.* **2013**, *40* (9), 805–818. <https://doi.org/10.1071/FP12359>
  78. Apel, K.; Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55*, 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.14170>
  79. Das, K.; Roychoudhury, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Env. Sci.* **2014**, *2*, 53. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
  80. Del Rio, D.; Stewart, A.J.; Pellegrini, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2005**, *15*, 316–328. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>
  81. Farahani, H.; Sajedi, N. A.; Madani, H.; Changizi, M.; Naeini, M. R. Physiological and biochemical responses of Damask rose (*Rosa damascena* Miller) to potassium silicate application under water deficit stress. *Not. Bot. Horti Agrobi.* **2020**, *48* (3), 1560–1572. <https://doi.org/10.15835/nbha48311808>
  82. Sevgin Zirek, N.; Uzal, O. The developmental and metabolic effects of different magnesium doses in pepper plants under salt stress. *Not. Bot. Horti Agrobi.* **2020**, *48* (2), 967–977. <https://doi.org/10.15835/nbha48211943>
  83. Yamane, K.; Mitsuya, S.; Kawasaki, M.; Taniguchi, M.; Miyake, H. Antioxidant capacity and damages caused by salinity stress in apical and basal regions of rice leaf. *Plant. Prod. Sci.* **2009**, *12* (3), 319–326. <https://doi.org/10.1626/pps.12.319>
  84. Wang, K.; Zhang, L.; Gao, M. Influence of salt stress on growth and antioxidant responses of two *Malus* species at callus and plantlet stages. *Pak. J. Bot.* **2013**, *45* (2), 375381.
  85. Liu, Y.-H.; Offler, C.E.; Ruan, Y.L. A simple, rapid, and reliable protocol to localize hydrogen peroxide in large plant organs by DAB-mediated tissue printing. *Front. Plant. Sci.* **2014**, *5*, 745. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00745>
  86. Kuźniak, E.; Urbanek, H. The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiol. Plant.* **2000**, *22*, 195–203. <https://doi.org/10.1007/s11738-000-0076-4>
  87. Izcapa-Treviño, C.; Loera, O.; Tomasini-Campocosio, A.; Esparza-García, F.; Salazar-Montoya, J.A.; Díaz-Cervantes, M.D.; Rodríguez-Vázquez, R. Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe) reaction involved in *Penicillium* sp. culture for DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane] degradation. *J. Environ. Sci. Health B* **2009**, *44*, 8, 798–804. <https://doi.org/10.1080/03601230903238368>