



**Universidad de Oriente
Faculta de Ciencias Naturales
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial**



**TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO ACADÉMICO DE MÁSTER EN
BIOTECNOLOGÍA
MENCIÓN AMBIENTAL**

TÍTULO: Bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal con capacidad de degradar compuestos clorofenólicos.

AUTOR: Lic. Lidieska Meriño Reyes

TUTORES: MSc. Irasema Pérez Potuondo
Dra. C. Rosa María Pérez Silva
Dra. C. Arelis Ábalos Rodríguez

CONSULTANTE: PH.D. Florina Ramírez Vives

Santiago de Cuba, 2016



Agradecimientos

A mis tutoras Irasema y Rosa María por brindarme todo su apoyo; por guiarme y orientarme siempre con una sonrisa en la realización de este trabajo.

A mis compañeros de estudios y trabajo, por formar parte de esta linda experiencia, en especial a mis amigos Isabel; Orquídea y Eduardo.

A mi mamá, mi hermano y mi papá por ayudarme en todo lo que necesité para vencer este reto.

A los trabajadores del Centro de Biotecnología Industrial (CEBI), en especial al profesor Manuel

A todos los que de una forma u otra contribuyeron a la realización de este trabajo, lleguen mi más sincero agradecimiento.

Reşumen

La rizosfera de las plantas en ambientes contaminados puede ser una fuente potencial de bacterias tolerantes y con capacidad de degradar los compuestos fenólicos que al mismo tiempo exhiban características de promotoras del crecimiento vegetal. Este trabajo tuvo como objetivo obtener bacterias de rizosfera de plantas con la capacidad de crecer en presencia de clorofenoles como única fuente de carbono y características de promotoras del crecimiento vegetal. Para esto, el suelo del Área de Movimiento y Almacenaje de Productos (MAP) de la Refinería Hermanos Díaz fue caracterizado por parámetros físicos y químicos y de ahí se colectaron las plantas que crecían en él, cuidando que sus raíces no fueran dañadas y depositadas en bolsas plásticas para preservarlas. Las características de promotoras de crecimiento vegetal fueron determinadas por técnicas colorimétricas cualitativas para la detección de metabolitos como ácidos orgánicos, ácido indolacético (IAA) y acetoína. Además se determinó el potencial para fijar el nitrógeno y solubilizar el fosfato. Se detectó la tolerancia a compuestos clorofenólicos y se determinó la capacidad de degradación al 2,4-D y 2,4-DCF. La caracterización físico y químico de los suelos estudiados reveló que los mismos poseen baja aireación por el alto contenido de grasas y aceites (130g.kg^{-1} de suelo) y muy bajo contenido de nitrato ($3,82\text{ mg.g}^{-1}$ de suelo), así como de fosfato ($5,6 \times 10^{-2}\text{mg.g}^{-1}$ de suelo). Se lograron obtener 63 aislados bacterianos de las rizosferas de 4 plantas, extraídas de los suelos contaminados estudiados, de estas el 93,6 % crecieron en medio mineral con 2,4-D y 49,2 % fueron capaces de crecer en el intermediario de la degradación del herbicida, 2,4-diclorofenol. El 82,5 % de las bacterias aisladas mostraron características de promotoras del crecimiento vegetal, de las cuales el 15,9 % (9) creció en los compuestos clorofenólicos ensayados, mostrando tolerancia a concentraciones de 500 a 1000 mg.L^{-1} para el 2,4-D, en cambio para el 2,4-DCF sólo toleraron concentraciones de 40, 60 y 80 mg.L^{-1} . Las pruebas bioquímicas mostraron que todas las bacterias seleccionadas son Gram positivas siendo la mayoría de forma bacilar y proteolíticas. Los 9 aislados rizobacterianos seleccionados con características de promotores de crecimiento vegetal tienen capacidad para degradar tanto el 2,4-D como el 2,4-DCF, siendo superior en 2,4-D con porcentajes que oscilan entre 62 y 72 %.

Abstract

The rhizosphere of plants in contaminated environments can be a potential source of bacteria tolerant and able to degrade the phenolic compounds while exhibiting characteristics of plant growth promoters. This study aimed to obtain bacteria from rhizosphere of plants with the ability to grow in the presence of chlorophenols as sole carbon source and characteristics of plant growth promoters. For this, the soil area Movement and Storage Products (MAP) of the refinery Hermanos Diaz was characterized by physical and chemical parameters and hence the plants growing in it were collected, making sure that their roots were not damaged and deposited in plastic bags to preserve them. The physical and chemical characterization of the soils studied revealed that they possess low aeration by the high content of fats and oils (130g.kg^{-1} soil) and very low nitrate (3.82 mg.g^{-1} soil) and phosphate ($5.6 \times 10^{-2}\text{ mg.g}^{-1}$ soil). Tolerance was detected chlorophenolic compounds degradability and 2,4-D and 2,4-DCF was determined. It managed to obtain 63 bacterial isolates from the rhizosphere of 4 floors, extracted from contaminated soils studied, 93.6% of these were grown in mineral medium 2,4-D and 49.2% were able to grow in the intermediate degradation herbicide, 2,4-dichlorophenol. 82.5% of bacteria isolated showed features of plant growth promoters, of which 15.9% (9) grew up in phenolic compounds tested, showing tolerance at concentrations of 500 to 1000 mg.L^{-1} for the 2,4-D, while for 2,4-DCF only tolerated concentrations of 40, 60 and 80 mg.L^{-1} . Biochemical tests showed that all selected Gram positive bacteria are being most bacillary and photolytic. 9 rhizobacterial selected isolates with characteristics of plant growth promoters have both the ability to degrade 2,4-D and 2,4-DCP, being higher in 2,4-D with percentages ranging between 62 and 72%.

Índice

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
I. CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	
I.1. Compuestos clorofenólicos xenobióticos.	4
<i>I.1.1. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).</i>	4
<i>I.1.2. 2,4-diclorofenol.</i>	5
<i>I.1.3. 4-clorofenol.</i>	5
I.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).	6
I.3. Degradación microbiana de compuestos clorofenólicos.	8
<i>I.3.1. Degradación de 2,4-D.</i>	9
I.4. Interacción planta-microorganismos para la degradación de compuestos xenobióticos.	11
II. PARTE EXPERIMENTAL.	
II.1. Materiales y Métodos.	13
<i>II.1.1. Origen y toma de las muestras.</i>	13
<i>II.1.2. Caracterización de los suelos.</i>	13
<i>II.1.2.1. Ensayo rápido de aireación de suelos.</i>	13
<i>II.1.2.2. Determinación de la capacidad de campo.</i>	14
<i>II.1.2.3. Determinación de sólidos totales, fijos y volátiles y contenido de humedad.</i>	14
<i>II.1.2.4. Determinación del pH del suelo.</i>	15
<i>II.1.2.5. Determinación de Aceites y Grasas.</i>	16
<i>II.1.2.6. Determinación de nitratos</i>	16
<i>II.1.2.7. Determinación de fosfato.</i>	16
II.2. Aislamiento y caracterización de rizobacterias a partir de plantas que crecen en suelos contaminados con compuestos clorofenólicos.	17
<i>II.2.1. Determinación de características bioquímicas y morfológicas de los aislados de rizobacterias.</i>	18
II.3. Determinación de la capacidad de las rizobacterias aisladas de crecer en medio mineral con clorofenoles como única fuente de carbono.	18
<i>II.3.1. Procedimiento.</i>	18
II.4. Determinación de características de promotoras de crecimiento vegetal en las rizobacterias aisladas.	19
<i>II.4.1. Medios de cultivos.</i>	19
<i>II.4.2. Procedimiento.</i>	20
II.5. Determinación de la tolerancia compuestos clorofenólicos de las rizobacterias aisladas.	21
<i>II.5.1. Adaptación del aislado bacteriano.</i>	22
II.6. Capacidad degradadora de los aislados rizobacterianos ante el 2,4-D y 2,4-DCP.	22

II.6.1.	<i>Degradación de los compuestos organoclorados.</i>	22
II.6.2.	<i>Determinación del porcentaje de degradación.</i>	23
II.6.3.	<i>Determinación de fenoles totales.</i>	23
II.7.	Determinación del crecimiento bacteriana por el método directo de viables.	24
II.8.	Análisis estadístico.	24
III.	CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
III.1	Caracterización física- química del suelo.	25
III.1.1.	<i>Aireación de los suelos.</i>	25
III.1.2.	<i>Capacidad de campo.</i>	27
III.1.3.	<i>Sólidos y aceites y grasas extraíbles.</i>	28
III.1.3.	<i>pH.</i>	29
III.1.6.	<i>Contenido de nitrato y fosfato en los suelos.</i>	30
III.2.	Aislamiento y catacterización de rizobacterias a partir de plantas que viven en suelos contaminados.	30
III.2.1.	<i>Capacidad de las rizobacterias de crecer en medio mineral con clorofenoles como única fuente de carbono.</i>	32
III.2.2	<i>Características bioquímicas y morfológicas de los aislados de rizosfera y promotoras de crecimiento vegetal.</i>	41
III.3.	Tolerancia de los aislados seleccionados a compuestos clorofenólicos.	43
III.4.	Degradación de compuestos clorofenólicos por las rizobacterias seleccionas promotoras del crecimiento vegetal.	46
	CONCLUSIONES.	50
	RECOMENDACIONES.	51
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	52
	ANEXOS.	

INTRODUCCIÓN

La protección de los cultivos agrícolas, y en general el combate de plagas, es muy antiguo. Hay referencias del uso de agentes químicos para proteger cultivos que datan de dos mil años o más.

Con el desarrollo extraordinario de la química a finales del siglo XIX y principios del XX, unido a un incremento y generalización del conocimiento del efecto de algunos compuestos químicos sobre insectos, enfermedades y malezas, se comenzó a usarlos a gran escala, sin tener en cuenta los efectos secundarios sobre los trabajadores agrícolas, la población consumidora y el medioambiente.

El problema de la contaminación por plaguicidas es cada vez más grave tanto por la cantidad y diversidad como por la resistencia a ellos que adquieren algunas especies, lo que ocasiona que se requiera cada vez mayor cantidad del plaguicida para obtener el efecto deseado en las plagas. Sin embargo, la flora y fauna oriundas es afectada cada vez más destruyendo la diversidad natural de las regiones en que se usan. Además, pueden ser consumidos por el hombre a través de plantas y animales (Santoyo F, 2009).

Actualmente se manifiesta una tendencia a favor del ambiente en cuanto a la reducción del uso de fertilizantes químicos y plaguicidas en general, y una mayor sensibilización social sobre el potencial riesgo de su empleo indiscriminado. Esto ha abierto nuevas perspectivas en el empleo de productos biológicos para el manejo integrado de la agricultura, sobre todo en la protección de cultivos (biocontrol) y como fertilizantes “amigos” del medioambiente (biofertilizantes).

En tal sentido, diferentes empresas e institutos de investigación vienen trabajando en el estudio de los microbios del suelo (microbiota), y en la compleja interacción planta-microorganismo. La integración de técnicas de estudio de la microbiología tradicional, junto con metodologías moleculares, incluyendo los avances en las técnicas de genómica, contribuirá a un mejor conocimiento del funcionamiento de las comunidades microbianas del suelo con el consiguiente potencial de aplicación biotecnológica.

Bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal con capacidad de degradar compuestos clorofenólicos.

En esteesentido, se ha demostrado la presencia de abundantes géneros: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Bacillus* y *Streptomyces* en diferentes condiciones ylocalidades edafoclimáticas, así como su asociación con las gramíneas (Hebbar *et al.*, 1998; Picard *et al.*, 2000; Riveset *et al.*, 2003).

Se destacan por su alta frecuencia de aparición en la rizosfera. *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* Entre sus mecanismos de acción se encuentranel aumento de la toma de agua y nutrientes por laplanta (González *et al.*, 2000), la producción de reguladoresdel crecimiento vegetal (De Salmone *et al.*, 2001) y el control biológico de patógenos, dado fundamentalmente por la producción de sideróforos (Alexander y Zuberer, 1991),la antibiosis y la inducción de resistencia a la planta (Nandakumar *et al.*, 2001).Diversos autores han demostrado la producción de fitohormonas por rizobacterias (Dibut, 2000). Dentro de ellas el Ácido Indol Acético (AIA) es la auxina más conocida y estudiada, desempeñando un papel rector en el crecimiento de los cultivos (Hernández, 1998).

La biodegradación o el uso de microorganismos para eliminar xenobióticos y compuestos orgánicos persistentes es un proceso amigable con el ecosistema. Es una tecnología barata donde los microorganismos son capaces de mineralizar los compuestos orgánicos contaminantes usándolos como fuente de nutrientes para sí o para otros microorganismos asociados. Se conocen muchas bacterias con la capacidad de degradar compuestos fenólicos entre ellos *Pseudomonas sp.* (*P. aeruginosa*), *Arthrobacter sp.* y *Bacillus sp.* (*B. cereus*) así como consorcios bacterianos (lodos activados) y cultivos mixtos (Arora y Bae, 2014).

A pesar del hecho de que la degradación de clorofenoles ha sido investigada existe un considerable interés en encontrar y conocer bacterias de los lugares contaminados con la capacidad de degradar compuestos clorofenólicos (Al-Thani y col, 2007; Veenagayathri y Vasudevan, 2011; Sankaralingam et al, 2013).

DISEÑO TEÓRICO

Tomando en consideración todos los elementos anteriormente expuestos, se planteó para el desarrollo de esta tesis de maestría el siguiente diseño teórico:

Problema Científico

¿Será posible aislar, partiendo de plantas que crecen en suelo contaminado con hidrocarburos y compuestos clorofenólicos, rizobacterias que al mismo tiempo sean capaces de crecer en presencia de clorofenoles como única fuente de carbono y además exhiban características de promotoras del crecimiento vegetal?

Hipótesis

Es posible encontrar rizobacterias de plantas que crecen en sitios contaminados que puedan crecer en compuestos clorofenólicos con potencialidad para degradar dichos compuestos y al mismo tiempo exhiban algunas de las características de promotoras del crecimiento vegetal.

Objetivo general

Obtener bacterias de rizosfera de plantas con la capacidad de crecer en presencia de clorofenoles como única fuente de carbono y características de promotoras del crecimiento vegetal.

Objetivos específicos

1. Realizar la caracterización físico-química de suelos impactados con compuestos clorofenólicos.
2. Aislar rizobacterias de plantas que viven en suelos contaminados con compuestos clorofenólicos.
3. Seleccionar las rizobacterias con características de promotoras del crecimiento vegetal y a su vez tolerantes a compuestos clorofenólicos.
4. Determinar la capacidad de degradación de compuestos clorofenólicos de las rizobacterias seleccionadas promotoras del crecimiento vegetal.

CAPÍTULO I. REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA

I.1 Compuestos clorofenólicos xenobióticos.

El uso de herbicidas ha aumentado en los países desarrollados o en vías de desarrollo durante las últimas décadas. Dentro del mercado mundial de los plaguicidas, merece resaltar el comercio de los herbicidas, representando 47% del total, seguido por los insecticidas (25%) y similares (28%) (Short, 2005).

Entre los innumerables herbicidas existentes, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es un ingrediente activo en varias formulaciones y ha sido ampliamente aplicado para controlar plantas dañinas dicotiledóneas en cultivos de caña de azúcar y cereales, como millo, trigo, avena, cebada y centeno (Donnelly y col, 1993).

I.1.1 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)(Figura I.1) es uno de los herbicidas fenoxialcanólicos más usados en el mundo (Wilson y col, 2009; Botré y col, 2009) y más de 1500 plaguicidas lo contienen como la sustancia activa principal (Fontmorin y col, 2013).

Este herbicida es un polvo cristalino incoloro, con olor a moho, se le conoce comúnmente como 2,4-D y es un herbicida clorofenólico. El 2,4-D es un herbicida sistémico que interfiere con las hormonas que regulan el crecimiento de las plantas. La acumulación del herbicida ocurre en las regiones meristemáticas de los retoños y las raíces; mimetiza el efecto de las auxinas u otras hormonas reguladoras del crecimiento de las plantas y estimula el crecimiento, rejuvenece las células viejas y sobreestimula las células jóvenes guiando a patrones anormales de crecimiento y la muerte de la planta (Mullison, 1987). Las plantas tratadas con 2,4-D muestran tallos, hojas y raíces malformadas, lo que demuestra que el compuesto afecta al metabolismo vegetal a través de los daños ocasionados a la actividad enzimática, la respiración y a la división celular (EPA, 1988).

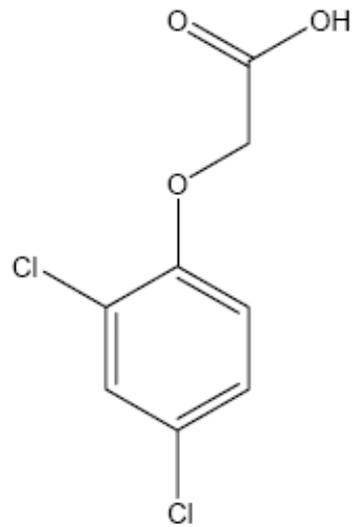


Figura 1. Estructura química del ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

1.1.2. 2,4-diclorofenol.

El 2,4-diclorofenol (Figura 1.2) es un intermediario en la fabricación del 2,4-D y generalmente el producto inicial de la degradación de éste (Perkins y col, 1990). Mientras 2,4-D es fácilmente degradado, el 2,4-diclorofenol es más recalcitrante y tóxico que el compuesto original y se ha mostrado su persistencia en el suelo donde la aplicación de 2,4-D es frecuente o alta (Short y col, 1991).

Es un sólido blanco a temperatura ambiente, puede ser inodoro o tener un aroma fenólico, es un compuesto tóxico y persistente que puede acumularse afectando a los ecosistemas y a la salud humana, por lo que es considerado como un contaminante peligroso y se ha identificado como compuesto prioritario por organismos de protección ambiental (Gemini y col, 2002).

El 2,4 diclorofenol es un producto de la degradación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético pero también puede originarse a partir del metabolismo de otros compuestos químicos o puede ser derivado durante la producción de otros compuestos. Es un xenobiótico que puede descomponerse en ácidos de bajo peso molecular, algunos de sus intermediarios son: 2-clorofenol, fenol, catecol, ácido oxálico y ácido fórmico (Yen, 2000).

1.1.3. 4-clorofenol.

El 4-clorofenol (figura 1.3) forma parte de la familia de los clorofenoles y representa un problema de contaminación para ambientes acuáticos y terrestres.

Es un sólido húmedo de color blanco a amarillo cristalino, generalmente se utiliza para fabricar otras sustancias químicas y se ha usado como antiséptico local, esterilizante y como disolvente; además se ha utilizado en diversas actividades industriales y en la industria farmacéutica (Kristiansen y col, 1994; Rogers y Gerlanch, 1996).

Este compuesto causa daños a la salud y es citado entre las sustancias peligrosas declarados por la agencia que regula el transporte de sustancias químicas y la Agencia de Protección al Medio Ambiente (EPA) (Santoyo F, 2009).

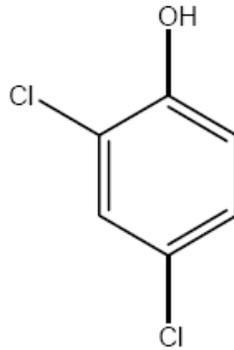


Figura I.2. Estructura química del 2,4-diclorofenol.

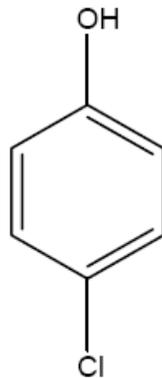


Figura I.3. Estructura química del 4-clorofenol.

I.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).

En respuesta a la necesidad de generar cultivos limpios, con trazas mínimas o nulas de agroquímicos que afecten la salud humana a largo plazo, se ha venido implementado el uso de los microorganismos benéficos del suelo, que pueden promover el crecimiento de las plantas y también evitar la infección del tejido vegetal por patógenos, estos son denominados PGPR (plant growth promoting rhizobacteria: rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal). Estos microorganismos pueden encontrarse en asociaciones simbióticas o de vida libre. Estos últimos están asociados a las partículas del suelo generando interacciones con las raíces de las plantas, en la zona de la rizosfera (Nihorimbere y col., 2011).

Dentro de los mecanismos para la promoción del crecimiento vegetal encontramos dos tipos, mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos son aquellos en donde los microorganismos actúan sobre la planta. Dentro de estos encontramos la producción de promotores de crecimiento vegetal (también llamados fitohormonas), como auxina, giberelinas y citoquininas.

La producción de estos metabolitos, también generan una mejor regulación de estomas, lo que evita su deterioro el cual está asociado a depresión del crecimiento y síntomas de marchitamiento en la planta. Ocasionan también un desarrollo radical más ramificado jugando un papel fundamental en la absorción del agua y en el mejoramiento de la nutrición al aumentar su acceso a los nutrientes en el suelo (Rivieros, 2008). Adicionalmente, las PGPR pueden promover el crecimiento vegetal mejorando la disponibilidad de nutrientes en el suelo mediante solubilización de fósforo, fijación de nitrógenos y producción de sideróforos (Bobadilla y Rincón, 2008). Igualmente se ha demostrado que las

rizobacterias ayudan a disminuir la resistencia a la conductividad hidráulica, lo cual le da a las plantas una mayor tolerancia a periodos de sequía (Rivieros, 2008).

Los mecanismos indirectos son aquellos en donde el microorganismo es capaz de inhibir diferentes patógenos que interfieren con el desarrollo de la planta. Fitopatógenos como hongos y bacterias son neutralizados por diversos mecanismos, como competencia por espacio o nutrientes, o también producción de metabolitos antibióticos, secreción de diversas enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de los patógenos (Morgan y col., 2005).

También se ha evidenciado la producción de sideróforos los cuales se definen como moléculas pequeñas con cadenas laterales y grupos funcionales que les proporcionan alta afinidad para captar y concentrar iones férricos. Estas moléculas son producidas típicamente por bacterias, hongos y plantas monocotiledóneas en respuesta al estrés por concentraciones limitantes de hierro en el ambiente (Pérez et al., 2008).

Debido a que la biodisponibilidad de hierro es limitada en el suelo, la producción de sideróforos juega un papel importante en la competencia por este recurso, ya que, en general, los sideróforos producidos por bacterias tienen una mayor afinidad a este elemento que los producidos por hongos, limitando así a posibles patógenos (Compant et al., 2005). Otro mecanismo indirecto es el incremento de la capacidad de respuesta sistémica de la planta frente a los patógenos (Vessey, 2003).

Aunque los estudios con microorganismos como *Pseudomonas fluorescens* habían basado únicamente en la utilización de su potencial como biocontrolador de fitopatógenos habitantes del suelo, los esfuerzos ahora comienzan a concentrarse en la capacidad de los PGPR de promover el desarrollo vegetal,

utilizándolos en la obtención de plantas más saludables y con mejores rendimientos de cultivo. También se incluyen en estos estudios microorganismos como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* (Dey et al. 2004) y actinomicetes (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006).

I.3. Degradación microbiana de compuestos clorofenólicos.

Los microorganismos, entre estos las bacterias, son capaces de remover o degradar residuos contaminantes para permitir su transformación en sustancias menos o no nocivas o su total eliminación del ambiente (Walker y col, 2000).

La biorremediación es un proceso mediante el cual las bacterias degradan o transforman contaminantes orgánicos tóxicos. Se han aislados microorganismos que pueden degradar varios contaminantes (nitroaromáticos, cloroaromáticos, aromáticos policíclicos, bifenilos, bifenilos policlorados y componentes de aceites) para utilizarlos en la biorremediación de sitios contaminados (Parales y Haddock, 2004). Sin embargo, algunos de los compuestos xenobióticos, como los compuestos nitrados y aromáticos halogenados, pesticidas y explosivos son muy estables y químicamente inertes bajo condiciones ambientales. Algunos de estos compuestos son metabolizados únicamente en presencia de una fuente de carbono alterna, ya que de lo contrario son solamente transformados, sin llegar a mineralizarse (Debarati y col, 2005).

Los procesos naturales que descomponen sustancias tóxicas en el medio ambiente se han convertido en tema de interés, conduciendo al desarrollo de tecnologías de remediación como garantía para un ambiente seguro y amigable. Los procesos involucrados en la biodegradación de plaguicidas, tales como hidroxilación del compuesto aromático, disociación, hidrólisis, dehalogenación,

desalquilación o formación de un conjugado, han sido muy estudiados en los últimos años proporcionando los fundamentos científicos para la utilización adecuada de los microorganismos en la remediación de sitios contaminados (Mulbry y Kearney, 1991; Chaudhry y col, 2002).

Las comunidades microbianas en ecosistemas contaminados tienden a ser dominadas por aquellos organismos capaces de utilizar y/o tolerar los compuestos tóxicos (Mac Naughton y col, 1999). Como resultado, estas son menos diversas que aquellos en ecosistemas no contaminados; aunque la diversidad también puede estar influenciada por la complejidad de la mezcla de compuestos presentes y por el tiempo que las poblaciones han estado expuestas (Hubert y col, 1999).

La capacidad de los microorganismos para metabolizar a los compuestos xenobióticos, depende en gran parte de su persistencia en el ambiente y de la toxicidad de esos contaminantes. Se han estudiado comunidades microbianas y cepas puras, con el fin de desarrollar sistemas que operan bajo condiciones aerobias o anaerobias para la degradación de plaguicidas (Singleton, 1993).

1.3.1. Degradación de 2,4-D.

La degradación microbiana es considerada la principal vía de descomposición del 2,4-D. El mecanismo de degradación más importante involucra la remoción de la cadena lateral de ácido acético involucrando a la alfa-cetoglutaratodioxigenasa para dar lugar al 2,4-diclorofenol liberando glioxilato. Posteriormente ocurre la ruptura del compuesto aromático produciendo ácidos alifáticos como el succínico y entrar al ciclo de los ácidos tricarbónicos (Ghassemiy col,1981).

Otra de las vías de degradación puede ser activando una dehalogenasa para formar el ácido 4-clorofenoxiacético, el cual se transforma en 4-clorofenol, que al formar el 4-clorocatecol puede ser degradado tanto por la vía orto como por la vía para y dar lugar a intermediarios que entran al ciclo de Krebs (Pieper y col, 2005; Young E, 2011; Arora y Bae, 2014)

Se han aislado muchas bacterias capaces de degradar el 2,4-D, entre las que se encuentran *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Arthrobacter*. Sin embargo, en muchos casos, la mineralización es baja o no ha sido medida. La posibilidad de un tratamiento biológico basado en cepas puras de bacterias permanece siendo limitada, y la remoción del 2,4-D ha sido estudiada con consorcios de bacterias, aisladas de muestras de suelo o de lodos activados de plantas de tratamiento de aguas residuales (Fontmorin y col, 2013).

Existen numerosos estudios sobre la degradación de xenobióticos, entre ellos los plaguicidas como el 2,4-D, donde se ha utilizado una gran diversidad filogenética de bacterias, por lo que no resultaría extraño que existiera una gran diversidad genética y bioquímica en las rutas usadas para la degradación del 2,4-D, es decir que las distintas rutas metabólicas pueden llegar a desarrollarse de manera independiente unas de otras.

Cuba emplea el herbicida 2,4-D (como éster iso-octílico o sales aminas) como el herbicida de elección para tratar la contaminación con plantas invasoras como las dicotiledóneas de hojas anchas, en los cultivos de caña de azúcar, tanto en la etapa pre-emergente como en la post-emergente antes del cierre de campo, así como antes de efectuar el corte de la misma para facilitar el mismo.

I.4. Interacción planta-microorganismos para la degradación de compuestos xenobióticos.

Los primeros estudios de la degradación de los compuestos por la rizosfera se enfocaron principalmente en los plaguicidas. Estos estudios sugirieron que las plantas se protegen de estos compuestos por las bacterias que lo degradan (Kala, 2014). Algunas técnicas de fitorremediación basadas en la interacción entre las plantas y sus microorganismos asociados han sido propuestas como métodos baratos, eco-amigables para limpiar los suelos contaminados. La fitorremediación asistida por microorganismos parece ser particularmente efectiva para contaminantes orgánicos incluyendo algunos compuestos orgánicos persistentes como es el lindano (Álvarez y col, 2012).

Investigaciones en las transformaciones microbianas en la rizosfera se han realizado principalmente con agroquímicos, como son los pesticidas y los fertilizantes. Las investigaciones han descrito la capacidad para la mineralización de varios plaguicidas por las comunidades microbianas que habitan la rizosfera, las cuales son mayores cuando la comparan con las comunidades microbianas de un suelo no vegetal (Anderson y col, 1995).

Algunos estudios realizados han referido la degradación de compuestos como el butaclor en el suelo de rizosfera del trigo inoculado con una comunidad microbiana (Dwivedi y col, 2010). Muchas bacterias degradadoras de plaguicidas se conocen que tienen la capacidad adicional de producir ácido indolacético, sideróforos y otros factores promotores del crecimiento vegetal, lo cual hace que sean más beneficiosas para la aplicación en suelos contaminados con la consiguiente biorremediación y el potencial de promover el crecimiento vegetal.

Recientes estudios mostraron la mineralización de los compuestos organoclorados en la interfaz raíz-suelo. Este efecto de la rizosfera es atribuido generalmente a la liberación de exudados por la raíz de la planta. Exudado que contiene compuestos solubles e insolubles en agua y volátiles que incluyen azúcares, aminoácidos, compuestos orgánicos, nucleótidos, compuestos fenólicos, flavononas y ciertas enzimas.

Al ser este exudado una mezcla compleja de sustratos, no solo proveen un hábitat rico en nutrientes para las bacterias degradadoras de contaminantes, sino que además pueden potencialmente incrementar la biodegradación en diversas formas: ellas pueden facilitar la transformación co-metabólica de los contaminantes con estructura similar, inducir enzimas catabólicas involucradas en el proceso de degradación y/o incrementar la biodisponibilidad del contaminante p.e con producción de ácido cítrico. En este contexto la estimulación de los microorganismos degradadores de organoclorados por medio de los exudados de las plantas se convierte en una estrategia útil para la remediación de ambientes contaminados (Álvarez y col, 2012).

Algunos investigadores utilizan microorganismos con capacidad reconocida de degradar compuestos tóxicos (p.e. *Pseudomonas sp.*), conociendo además que son rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y han utilizado ambas capacidades para lograr la degradación de la atrazina en campos sembrados con maíz, observando disminución de la contaminación con el compuesto al mismo tiempo de mejor desarrollo del cultivo (Chegini y col, 2015).

CAPÍTULO II. Parte
Experimental

Esta investigación se realizó en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), perteneciente a la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, en el periodo de Mayo del 2015 a Mayo 2016.

II.1 Materiales y Métodos.

II.1.1. Origen y toma de las muestras.

Las muestras de suelos contaminados proceden del Área Movimiento y Almacenaje de Productos (MAP) de la Refinería Hermanos Díaz localizada en el área costera de Santiago de Cuba. La toma de muestras se realizó entre las 9:00 y 11:00 am, aplicando la técnica de cuarteo (Alexeiev, V. N. 1978), siendo la extracción a una profundidad de 5.0 cm. Las muestras se homogenizaron en un tamiz 0,42 mm. (OGAWA SEIKI CO. LTD. Japón).

II.1.2 Caracterización de los suelos.

El análisis granulométrico del área de estudio correspondió al referido en Nápoles y col (2015) La determinación de los sólidos totales, totales fijos y totales volátiles así como el ensayo de aireación se realizaron según Jackson (1979). El pH, contenido de nitrógeno y fósforo, según APHA (2005).

II.1.2.1 Ensayo rápido de aireación de suelos.

Para realizar el ensayo se dobló un papel de filtro a lo largo de sus diámetros y se colocaron dos muestras de suelo (punta de una espátula) en los extremos opuestos del papel. Se añadieron dos gotas de HCl $c(x/Z^*)=0,1$ N (Quinsa. Unión Química. Cuba) a cada una de las muestras y una gota de la disolución de Tiocianato de potasio (KCNS) (Merck. Alemania) y otra de Hexacianoferrato (III) de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) (Merck. Alemania) en las zonas húmedas. La aparición de

coloración roja con KCNS indica la presencia de hierro férrico. La aparición de color azul con $K_3Fe(CN)_6$, indica la presencia de hierro ferroso.

II.1.2.2 Determinación de la capacidad de campo.

Una cantidad de tierra conocida, secada previamente a $105^{\circ}C$ (Estufa Laborgeräte, Berlín), se dispuso sobre un embudo con papel de filtro para impedir el paso de la tierra (el peso del papel de filtro se tuvo en cuenta). Se regó el sistema con agua destilada hasta quedar completamente empapado. Cuando cesó el goteo de agua por el embudo se pesó el conjunto del papel con la tierra húmeda. Descontando de este valor el peso de la tierra seca y el peso del papel de filtro (realizando todo el proceso sin tierra) se obtuvo el peso del agua que retiene la muestra de tierra.

La capacidad de campo en porcentaje se obtuvo al dividir el peso de agua retenida entre la cantidad de tierra seca dispuesta por 100.

II.1.2.3 Determinación de sólidos totales, fijos y volátiles y contenido de humedad.

Se pesó la cápsula vacía en balanza analítica (Sartorius BP121S) y se le añadió 1g de tierra, tomando este valor. Se colocó la muestra en la estufa a $105^{\circ}C$ por 1 hora para eliminar el contenido de agua, hasta peso constante. Se enfrió en desecadora y se pesó, anotando el valor, luego se determinó los sólidos totales.

Se colocó la muestra en la mufla (Selecta. Madein E.E.C.) a $550^{\circ}C$ durante 1 hora hasta peso constante para eliminarla materia orgánica y determinar los sólidos totales fijos.

Los cálculos se realizan según las siguientes fórmulas:

Sólidos totales

$$\%ST = \frac{(Ps(105^{\circ}C))}{P_{muestra}} * 100 \quad \text{Ecuación II.1}$$

Sólidos totales fijos

$$\%STF = \frac{Ps(550^{\circ}C)}{Ps(105^{\circ}C)} * 100 \quad \text{Ecuación II.2}$$

Sólidos volátiles

$$\%SV = \frac{(Ps(105^{\circ}C) - Ps(550^{\circ}C))}{Ps(105^{\circ}C)} * 100 \quad \text{Ecuación II.3}$$

Contenido de humedad

$$\% \text{ humedad} = 100 - \%ST \quad \text{Ecuación II.4}$$

Donde: Ps (105°C) es el peso seco de la muestra en la estufa (g), Ps (550°C) es el residuo de la muestra en la mufla (g), P muestra es el peso inicial de la muestra de tierra (g)

II.1.2.4 Determinación del pH del suelo.

La determinación se realizó pesando 10 g de suelo para luego verterlos en un matraz de 50 mL. Se añadieron 25 mL de agua destilada y se agitó de 20 a 30 minutos a intervalos regulares, luego se midió el pH de la suspensión acuosa. (pHmetro Consort C561).

II.1.2.5 Determinación de Aceites y Grasas.

El contenido de Aceites y Grasas se determinó mediante extracción en equipo de destilación Soxhlet con diclorometano. Este método consiste en extraer los hidrocarburos contenidos en el suelo mediante la acción de un solvente orgánico volátil que es refluado a través de la muestra varias veces durante un tiempo determinado. El solvente es evaporado y posteriormente condensado en un refrigerante, se le hace pasar por la muestra y se le regresa al origen para ser nuevamente evaporado.

II.1.2.6 Determinación de nitratos.

La determinación de nitrógeno como nitrato se hizo por el método espectrofotométrico UV (Espectrofotómetro Pharmacia kb-Ultrospeciii) ($\lambda=220$ nm). En caso de que exista materia orgánica en la muestras se lee a 220 nm y 275 nm, lo que permite que se realice la corrección de las lecturas. En el análisis se utiliza $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5:1000) (BDH AnalaR. Inglaterra como solución extractora.

II.1.2.7 Determinación de fosfato.

Se determinó empleando el método espectrofotométrico por formación de un complejo coloreado heteropoliácido molibdofosfórico conocido como azul de molibdeno, formado con el reactivo molibdato de amonio en medio neutro, el cual presenta un máximo de absorción a 590 nm. La estabilidad del complejo se alcanza a partir de los 30 minutos. En el análisis se utiliza H_2SO_4 ($C(x/Z^*)=0.002$ N (Quinsa. Unión Química. Cuba) como solución extractora.

II.2. Aislamiento y caracterización de rizobacterias a partir de plantas que crecen en suelos contaminados con compuestos clorofenólicos.

Se colectaron ejemplares de plantas que crecían en el Área Movimiento y Almacenaje de Productos (MAP) de la Refinería Hermanos Díaz dentro de un área de 56 m². Parte de los ejemplares extraídos se destinaron para la identificación botánica de las plantas mientras que otros fueron llevados al laboratorio para el aislamiento de las bacterias. Las plantas fueron extraídas con la tierra que las rodeaba tratando de tomar toda la raíz sin que esta sufriera afectación (a una profundidad de 0-20 cm) y depositada en bolsas plásticas para su traslado.

Las plantas fueron sacudidas ligeramente para limpiarles el exceso de tierra. En condiciones de esterilidad las raíces fueron cortadas e inmediatamente sellados los cortes con parafina para prevenir contaminación con bacterias endofíticas. Se pesó 1g de raíces que fue depositado en frascos con 10 mL de agua destilada estéril. Los frascos fueron llevados a un sonicador para obtener en la solución las rizobacterias. Las condiciones del sonicador fueron dos intervalos de 2 min con 120 seg de pulso cada uno con un total de 4 min para cada muestra, mantenida en un baño de hielo. Se dejó reposar unos minutos.

Se tomó 1mL de la suspensión y se realizaron diluciones seriadas del mismo utilizando como diluyente la solución de MgSO₄.7 H₂O, 10mM. Se inocularon 10 µL de cada dilución y de la suspensión en placas con agar nutriente. Las placas fueron incubadas de 24-40 h a 30 °C. Las colonias se seleccionaron tomando en cuenta diferencias en la morfología de las mismas. Las colonias separadas fueron sembradas sucesivamente en otras placas con agar nutriente para su purificación. Las bacterias aisladas fueron llevadas a tubos con cuñas de agar nutriente a 4°C.

II.2.1. Determinación de características bioquímicas y morfológicas de los aislados de rizobacterias.

Para conocer características bioquímicas y morfológicas de cada aislado se desarrollaron varias pruebas como: tinción de Gram según lo descrito por Bergeys, (1994);

II.3. Determinación de la capacidad de las rizobacterias aisladas de crecer en medio mineral con clorofenoles como única fuente de carbono.

Los experimentos fueron realizados utilizando compuestos clorofenólicos grado reactivo: 2,4-diclorofenol (SIGMA-ALDRICH), Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (SIGMA-ALDRICH).

II.3.1. Procedimiento.

Para seleccionar los aislados bacterianos capaces de crecer en presencia de clorofenoles como única fuente de carbono se utilizó un medio mineral libre de cloro (MMS), consistente en Buffer fosfato 20mM (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , pH 7,2), 0,5 g.L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0,2 g.L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada suplementado con 10 mL de una solución de elementos trazas con composición (en mg.L^{-1}) de: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 600; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 20; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 40; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20; H_3BO_3 , 3; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 y acidificada con 1 mL de ácido sulfúrico concentrado por litro (Kröckel y col, 1987). Al medio se le adicionó 1,5 g.L^{-1} de agar, el indicador bromotimol azul (0,04 g.L^{-1}) así como 2,4-D (0,2 g.L^{-1}).

Los aislados que fueron capaces de crecer y mostrar un cambio de color en la colonia o el medio de azul a amarillo fueron tomados como positivas (Lin y col, 2008).

Las bacterias seleccionadas anteriormente fueron sembradas en 2,4-D y 2,4-DCP como única fuente de carbono para ver su capacidad de crecer. Para ello las bacterias fueron inoculadas en placas con medio MMS suplementado con 2,4-D y 2,4-DCP (ambos a $0,02 \text{ gL}^{-1}$) e incubadas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta 5 días para evaluar el crecimiento. Se emplearon como controles placas de los medios que no fueron inoculados. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

Las bacterias que fueron capaces de crecer en presencia de clorofenoles fueron seleccionadas observando la capacidad de crecer en uno o todos los compuestos ensayados. Este crecimiento fue tomado como criterio de capacidad de degradar los compuestos clorofenólicos ensayados (Ahemad y Saghir, 2011).

II.4.Determinación de características de promotoras de crecimiento vegetal en las rizobacterias aisladas.

La capacidad de las bacterias aisladas para promover el crecimiento vegetal fue determinada atendiendo a varias propiedades como: capacidad para producir ácidos orgánicos, la auxina ácido indolacético (IAA) y acetoína. Además se determinó el potencial para fijar el nitrógeno y solubilizar el fosfato.

II.4.1 Medios de cultivos.

Medio-ST (medio Sacarosa-triptona para determinar la producción de ácidos orgánicos) se compuso de (g.L^{-1}): Sacarosa (20), Triptona (5), solución de elementos trazas (SET) (10 mL). La solución SET estuvo compuesta por (mg por litro): $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20), H_3BO_3 (200), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (20), FeCl_3 (100), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (20), ZnCl_2 (280) (Cunningham y Kuiack, 1992).

Medio NBRIP (medio National Botanical Research Institute's Phosphate, para determinar la capacidad solubilizadora de fosfato) se compuso de (g.L^{-1}): Glucosa

(10), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (5), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,25), KCl (0,2), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1), agar (15) (Nautiyal C, 1999).

Medio Voges-Proskauer (medio para determinar la producción de acetoina) se compuso de ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): Peptona (7), Glucosa (5), KH_2PO_4 (5), pH 7,0 \pm 0,2.

II.4.2 Procedimiento.

La capacidad de las bacterias aisladas para promover el crecimiento vegetal fue evaluada atendiendo a varias propiedades como: capacidad para producir ácidos orgánicos, la auxina ácido indolacético (IAA) y acetoina. Además se determinó el potencial para fijar el nitrógeno y solubilizar el fosfato.

La producción de ácidos orgánicos se evaluó acorde al método colorimétrico de (Cunningham y Kuiack 1992), adicionando el indicador Alizarina roja al 0,1 % luego de inocular las bacterias en medio sacarosa-triptona (ST). El indicador cambia de rosa al amarillo por la acumulación de los ácidos orgánicos en el medio.

La producción de ácido indolacético (IAA) se evaluó mediante el ensayo de Salkowski (adaptado de Patten y Glick, 2002). Esta producción se ensayó inoculando las bacterias en medio rico suplementado con $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de triptófano. Después de la incubación se añadió 1 mL del reactivo de Salkowski. La positividad del ensayo se observó mediante el cambio de amarillo a rosa producto de la unión de las moléculas de IAA al hierro del reactivo (Gordon y Weber, 1951).

Las cepas que utilizan la vía del butilenglicol para producir acetoina, fueron detectadas, inoculando las mismas en medio Voges-Proskauer. Luego de 48 h de incubación se indujo una respuesta colorimétrica acorde a (Romick y Fleming 1998), para observar las colonias positivas mediante la cual la acetoina producida

se transforma en di-acetil dando una coloración rosa-rojiza al combinarse con α -naftol y KOH.

La capacidad de fijar el nitrógeno fue ensayada por el método descrito por Xie y col (2006). Las bacterias fueron cultivadas en medio N con bromotimol azul como indicador del cambio de pH ocurrido. El medio fue preparado con y sin NH_4Cl como fuente de nitrógeno mineral e incubado 336 h a 30 °C. Se evaluó el cambio de color. Solo las bacterias que poseen la enzima nitrogenasa, que catalizan la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, provocan el cambio de color en el medio sin NH_4Cl .

El ensayo para detectar las bacterias que solubilizan el fosfato fue desarrollado acorde a (Nautiyal C 1999). Las cepas crecidas en un medio rico, fueron inoculadas en placas con medio NBRIP que contiene el fosfato en una forma insoluble ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e incubadas a 28 °C por 12 días. Se evaluó el halo (zona de solubilización) alrededor de las colonias reportando su diámetro en cm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

II.5. Determinación de la tolerancia compuestos clorofenólicos de las rizobacterias aisladas.

Los aislados rizobacterianos obtenidos; se determinó la tolerancia frente a compuestos clorofenólicos como el 2,4-D y el 2,4-DCP por el método de dilución en placa de agar según; las diluciones estuvieron en un intervalo de 10^{-1} a 10^{-8} mL^{-1} . Se inocularon 25 μL de los aislados rizobacterianos extraídos y luego sembrados en placas con agar nutriente incubándose durante 24 horas durante cinco días; controlando la viabilidad de los cultivos y el efecto bactericida del compuesto. La mayor concentración de estos compuestos que soporten el

crecimiento de los aislados rizobacterianos se definió como el Nivel de Tolerancia Máxima (NTM).

II.5.1. Adaptación del aislado bacteriano.

Los aislados bacterianos ensayados fueron inoculados en estría de agar nutriente con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2,4 diclorofenol (2,4 -DCP) respectivamente a $0,08 \text{ g.L}^{-1}$. Se incubaron de 24-48 horas a $33 \text{ }^{\circ}\text{C}$. El crecimiento fue recogido con medio mineral salino libre de cloro (MMS), lavado y resuspendido en igual medio hasta alcanzar una concentración de entre 1-2 Mc Farland ($1-6 \times 10^8 \text{ cel/mL}$). (http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf).

Posteriormente se añadieron 2 mL de la suspensión anterior en 50 mL de MMS, incubándose en agitación durante 24-48 horas. Transcurrido el tiempo fueron centrifugados y resuspendidos los pellet celulares en medio MMS hasta alcanzar la concentración de partida.

II.6. Capacidad degradadora de los aislados rizobacterianos ante el 2,4-D y 2,4-DCP.

II.6.1 Degradación de los compuestos organoclorados.

En erlenmeyers con 100 mL de Medio Mineral Salino libre de cloro según Kröckel y Focht, (1987), se añadió 2,4-DCP ($0,02 \text{ g.L}^{-1}$) y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); a los frascos se les añadió 1 mL del inóculo adaptado ($1-6 \times 10^8 \text{ cel/mL}$) y se llevaron a incubación en agitación, a temperatura 30°C . El muestreo se realizó a intervalos regulares de 24 horas. Cada variante fue ensayada por triplicado. Se utilizaron controles para evaluar la degradación abiótica de los compuestos.

II.6.2. Determinación del porcentaje de degradación.

La remoción del compuesto aromático en muestras fue monitoreada con un espectrofotómetro (Ray Leigh UV-2601) a través de la lectura del espectro UVvis. Previo a la realización de la lectura espectrofotométrica a un intervalo de longitudes de onda de 200-700 nm, las muestras y controles fueron filtradas para eliminar las células o partículas en suspensión, procedimiento realizado a los diferentes tiempos de incubación.

La longitud de onda de trabajo se seleccionó del barrido espectral realizado en el intervalo de 200 y 700 nm. Las curvas fueron preparadas a partir de estándares en el intervalo de 0,02-0,1 mg.L⁻¹ para los compuestos bajo estudio. El porcentaje de degradación se calculó según la ecuación II.5.

$$\% \text{ Degradación} = \frac{C_i - C_f}{C_i} * 100 \quad \text{Ecuación II.5}$$

Donde: Ci es la concentración inicial de fenoles y Cf es la concentración final.

II.6.3. Determinación de fenoles totales.

La concentración de fenoles fue medida mediante el método colorimétrico de la 4-aminoantipirina basado en el procedimiento descrito en el Standard Methods for the Determination of Water and Wastewater (APHA, 2005) modificado por (Farrell y Quilty 1999).

Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 min y el sobrenadante resultante fue diluido para ajustar la concentración dentro del rango de la curva de calibración. Los patrones estuvieron en el rango de 1-9 mgL⁻¹ de 2,4-D y 2,4-DCP en agua destilada. Se depositaron en tubos de ensayo de 25 mL, 10 mL de muestra, patrón o blanco y se les adicionó 0,25 mL de NH₄OH 0,5N; luego con buffer fosfato potasio, se ajustó el pH a 7,8± 0,1 unidades (pH 6,8). Se añadieron

100 μ L de una solución de 4-aminoantipirina al 2 % homogenizando la mezcla, para la posterior adición de 100 μ L de solución de ferricianuro de potasio al 8% homogenizando la mezcla, la cual fue incubada durante 15 min a temperatura ambiente. La densidad óptica de lectura fue 500 nm y la concentración se calculó según la ecuación de la recta de los estándares.

II.7. Determinación del crecimiento bacteriana por el método directo Viables.

El crecimiento microbiano se determinó por conteo de viables, preparando una serie de diluciones hasta 10 según el crecimiento microbiano y se sembró por diseminación por duplicado en placas con agar nutriente con 0.01mL de la solución escogida. Se incubó 24 horas y se leyó la cantidad de colonias crecidas. Se calculó la unidad formadora de colonias por mL (UFC/mL) de la muestratomada, graficando Log UFC/mL vs el tiempo (h) (Madigan y Col, 2000).

II.8. Análisis estadístico.

Los datos experimentales se sometieron a tratamiento estadístico, empleando el programa STATGRAPHICS Centurion XV. Cálculo de la media y desviación estándar de los parámetros microbiológicos a partir de los valores obtenidos en cada medición de las muestras (por duplicado), tanto para crecimiento microbiano como para degradación de hidrocarburos.

CAPÍTULO III. RESULTADOS
Y DISCUSIÓN

Se ha demostrado que las rizobacterias tienen la capacidad de producir metabolitos de interés agrícola, Estos microorganismos juegan un papel importante en el crecimiento y la aptitud ecológica de su anfitrión. Una comprensión de los principios básicos de la ecología microbiana de la rizosfera, incluyendo la función y la diversidad de microorganismos que residen en ella.

III.1 Caracterización física- química del suelo.

La salud del suelo se define como la continua capacidad de funcionar como un sistema vital, para mantener la productividad biológica, promover la calidad del agua y del aire y mantener la salud de plantas, animales y seres humanos (Karlen y col, 1997). La incorporación de sustancias contaminantes en los suelos tiene como consecuencia el deterioro de sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

La muestra de suelo se tomó a 5,0 cm de profundidad y se tamizó hasta 0,42 mm para eliminar las piedras y fracciones más gruesas de la tierra. La muestra exhibía un fuerte olor a hidrocarburos, aspecto lodoso y compacto debido a la cantidad de petróleo presente. Se estima que más del 90% de la carga total de hidrocarburos del suelo se encuentra en la capa superficial (15 cm), donde la mayoría de estos compuestos se acumula. (Gómez y col, 2008).

De acuerdo al análisis granulométrico realizado por Nápoles y col. (2015), el suelo del área de estudio está compuesto por un 76,7 % de arena; 6,9 % de grava y 16,4 % de arcilla, por lo cual se considera como un suelo arenoso.

III.1.1 Aireación de los suelos.

Posiblemente el efecto más importante de la pobre aireación del suelo sobre los procesos microbiológicos es la disminución del coeficiente de oxidación de la materia orgánica. Los organismos aerobios son incapaces de sobrevivir en ausencia de oxígeno. Por ejemplo, las bacterias responsables de la oxidación de

los elementos de nitrógeno (nitrificantes) y azufre son casi inactivas en suelos poco aireados. Solo los organismos anaerobios y facultativos se desarrollan bajo condiciones de pobre aireación.

La utilización de enzimas oxigenasas es clave en la degradación de contaminantes orgánico por lo que la disponibilidad de oxígeno molecular es un factor limitante. Además la aireación del suelo va a favorecer la degradación de los contaminantes por dos vías, debido a la volatilización, facilitando la migración de la fase volátil de los contaminantes, y debido a la biodegradación, ya que al incrementar la oxigenación del suelo se van a estimular la actividad bacteriana (Prakash y col, 2005).

El ensayo de aireación de suelos detectó una baja oxigenación en la muestra ya que se observó prueba positiva para hierro ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}) (Fig. III.1). Además se observó que la tierra tiene una tonalidad parda muy intensa, estos matices oscuros predominan si hay insuficiencia de oxígeno de aire.

Si bien por el contenido de arena presente en los suelos del área de estudio era de esperar una buena oxigenación de los mismos, el ensayo evidenció un déficit de oxígeno que está estrechamente relacionado con la presencia de petróleo en el sitio, situación que dificulta la circulación de aire y medio acuoso edáfico. (De Almeida y col, 2010).



Figura III.1. Resultado del ensayo de aireación de suelos.

III.1.2. Capacidad de campo.

La humedad del suelo es fundamental para la evolución y desarrollo de los microorganismos presentes en él ya que favorece el transporte de los nutrientes y oxígeno a través de las membranas celulares, además de ser vital para la actividad enzimática. La capacidad de campo es una medida del contenido de agua que es capaz de retener el suelo, es el agua contenida en el suelo luego del drenaje.

Los microorganismos requieren condiciones mínimas de humedad para su crecimiento pero un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo y favorecer la lixiviación de sales y otros compuestos (Maroto y Rogel, 2005). El porcentaje óptimo de humedad del suelo para los tratamientos de biorremediación aeróbica se encuentra entre un 10 y un 20 % y los valores óptimos de capacidad de campo oscilan entre el 50 y el 80% según Prakash y col (2005).

Los resultados del ensayo indican que el suelo posee un 24,76 % \pm 0,93 de capacidad de campo (Tabla III.1) y un 3, 93 % de humedad. Este valor de capacidad de campo dista del óptimo para los tratamientos de biorremediación aeróbica; la textura de este suelo, de tipo arenoso, determina una alta permeabilidad y un bajo nivel de retención de agua. Si comparamos este resultado con el obtenido por Nápoles y col (2015) (9,68%) se aprecia que el valor de capacidad de campo fue mayor. Se considera que este suelo pueda tener una mayor cantidad de hidrocarburos que actúa como un impermeabilizante sellando los poros entre los granos de arena propios del suelo.

Tabla III.1. Resultados de la caracterización de la muestra de suelo.

Parámetros	Muestra de suelo
Capacidad de campo (%)	24,76 ± 0,93
Sólidos totales (%)	96,07 ± 0,17
Sólidos totales fijos (%)	79,18 ± 0,23
Sólidos volátiles (%)	20,81 ± 0,23
pH (Unidades)	7,23 ± 0,07
Aceites y grasas (g.kg ⁻¹ de suelo)	130,00
Nitrato (mg.g ⁻¹ de suelo)	3,82
Fosfato (mg.g ⁻¹ de suelo)	5,60 x 10 ⁻²

III.1.3 Sólidos y aceites y grasas extraíbles.

La cantidad de aceites y grasas extraíbles en los estudios de biodegradación corresponde a la cantidad de hidrocarburos que se extrae con diclorometano. La extracción Soxhlet es uno de los recursos más empleados en los análisis de HTP y compuestos que derivan del petróleo. Es un procedimiento para la extracción de compuestos orgánicos no volátiles y semivolátiles de sólidos, como suelos, lodos y residuos. Este método asegura el contacto íntimo de la matriz de la muestra con el solvente de extracción. La extracción de hidrocarburos del petróleo por Soxhlet provee fracciones de C₆ a C₅₀ referido por Pons y col (2011).

El porcentaje de aceites y grasas extraído de la muestra de suelo fue de 130 g.kg⁻¹ de suelo (Tabla III.1), lo que corresponde al porcentaje de hidrocarburos de la muestra.

En estudios sobre la relación de rasgos hidromórficos, mineralogía, y actividad biológica de suelos tropicales como variables de impacto en la acumulación de hidrocarburos, se ha mencionado que los suelos arenosos presentan condiciones oxidantes generadas por los poros de conducción, que favorecen la degradación de hidrocarburos y hacen que las concentraciones sean bajas. Por esta razón la concentración de hidrocarburos en estos suelos, debería ser baja, situación que de no observarse puede atribuirse a la antigüedad del derrame, la composición del crudo presente, y la posible presencia de compuestos con alto peso molecular (alquilaromáticos y alcanos ramificados) según Pons y col (2011).

En cuanto al fenómeno de *ageingo* envejecimiento de la contaminación, Adetutu et al. (2013) refieren que la tasa de biodegradación de los hidrocarburos puede verse afectada por la edad de la contaminación ya que con el tiempo disminuye la fracción libre de los hidrocarburos disponible para la degradación por parte de la microbiota del suelo. Este efecto se produce por una serie de fenómenos como son: la adsorción a la materia particulada del suelo, absorción a la materia

orgánica del suelo, a la baja difusividad de los compuestos, principalmente desde los microporos, o a la formación de uniones covalentes con la materia orgánica e inorgánica del suelo.

Durante el tratamiento a 105 °C para la determinación de los sólidos totales se volatilizan parafinas, isoparafinas y naftenos de bajo peso molecular con temperatura de ebullición entre 20 y 150 °C desapareciendo el olor a hidrocarburos. El contenido de sólidos totales fue de 96,07 % \pm 0,17. La fracción inorgánica, expresada por los sólidos totales fijos, fue de un 79,18 % \pm 0,23.

A su vez el contenido de sólidos volátiles, que se compone fundamentalmente de hidrocarburos, fue de 20,81 % \pm 0,23. (Tabla III.1). Nápoles y col, 2015, muestran resultados similares de sólidos totales (96,3 %) para un suelo procedente de la misma zona de estudio, sin embargo muestra valores mayores en los sólidos fijos (93 %) y por lo tanto menores en los sólidos volátiles (7%) lo que podría sugerir, entre otros escenarios, la existencia de un incremento considerable en el aporte de contaminantes en la zona recientemente.

III.1.3 pH.

Al analizar los valores de pH se puede apreciar que en el suelo están presentes iones que aportan características básicas (CO_3^{2-} , HCO_3^- y otros), ya que todos son superiores a 7 (7,23 \pm 0,07) (Tabla III.1). El crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8. Así mismo el pH también afecta directamente en la solubilidad del fósforo y en el transporte de metales pesados en el suelo. La acidificación o la reducción del pH en el suelo se puede realizar adicionando azufre o compuestos del azufre. (Maroto Arroyo y Quesada, 2002). El pH disminuye a medida que decrece la relación agua:suelo y puede variar también con cambios de la concentración de CO_2 y con el proceso de nitrificación del suelo.

III.1.6 Contenido de nitrato y fosfato en los suelos.

El contenido de nitrato es muy bajo, $3,82 \text{ mg.g}^{-1}$ de suelo mientras que el de fosfato es de $5,6 \times 10^{-2} \text{ mg.g}^{-1}$ de suelo (Tabla III.1). Esto indica que no existe una concentración suficiente de nutrientes en los suelos para que la población microbiana pueda asimilar y degradar los contaminantes siendo necesaria, en el caso de una posible biorremediación, la bioestimulación con nutrientes. Comparando estos resultados con Nápoles y col. (2015) se observa que el contenido de nitrato es prácticamente el mismo ($3,5 \text{ mg.g}^{-1}$ de suelo), sin embargo el contenido de fosfato de este estudio es mayor que el reportado por estos autores ($4 \times 10^{-4} \text{ mg.g}^{-1}$ de suelo). El suelo objeto de análisis está sometido continuamente a aportes de contaminantes de residuos industriales, sería necesario estudiar a qué se debería el aporte de fosfato al suelo.

Frecuentemente los suelos impactados con hidrocarburos y otros xenobióticos están deprimidos en fuentes nitrogenadas y fosfatadas. La relación óptima C/N/P es 100/10/1. El metabolismo microbiano requiere fuente de carbono, nitrógeno y fósforo fundamentalmente. La fuente de carbono puede ser el hidrocarburo al aportar el carbono necesario para producir compuestos celulares y biomasa. El nitrógeno interviene en la síntesis de aminoácidos y enzimas, y el fósforo actúa en la formación de los compuestos energéticos celulares que se utilizan en los procesos de síntesis y degradación según Nápoles y col. (2015).

III.2 Aislamiento y caracterización de rizobacterias a partir de plantas que viven en suelos contaminados.

Se muestreó en áreas de una refinería donde la literatura muestra que los suelos cercanos se encuentran contaminados no solo con petróleo sino con compuestos fenólicos de diverso tipo que se forman durante el proceso de refinación o que acompañan al crudo. En el lugar muestreado se encontró abundancia de plantas, generalmente herbáceas y pocos ejemplares de tipo arbustivo. Se observaron

cuatro tipos distintivos y tres de ellos con gran cantidad de ejemplares. Se tomaron muestras de estos ejemplares y se trasladaron al laboratorio (Figura III.2).

Las plantas fueron identificadas en el Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO). Los ejemplares recogidos tuvieron dos representantes de la Familia Cyperaceae: *Cyperus rotundus* L (planta 1) y *Scleria* sp (planta 2) y un representante de la Familia Poaceae: *Cynodon dactylon* (L) (planta 3). Todas son de la Clase Monocotyledonea. Anexo III.1.

Se tomaron también ejemplares representantes de la Familia Fabaceae, especie *Cassia* sp. (planta 4) perteneciente a la Clase Magnoliopsida.

Las raíces de tres de las plantas fueron fibrosas, características de las raíces de las monocotiledóneas. Para obtenerlas se rechazó la parte más cercana al tallo y superficie del suelo utilizando el resto de la raíz.

La cuarta planta perteneciente a las Magnoliopsida tenía la raíz pivotante con raíces secundarias, característica de las plantas dicotiledonéas. Para obtener la muestra de estas se rechazó la parte cercana al tallo y superficie del suelo, tomándose las raíces secundarias y la raíz principal para la obtención de las bacterias.

Se realizó el conteo de bacterias de la solución obtenida luego de la sonicación de las raíces de las plantas muestreadas. Se observó en todas las soluciones una elevada concentración de colonias, siendo mayores para las especies *Scleria* sp y *Cassia* sp (plantas 2 y 4 respectivamente) (Tabla III.2). Los aislados bacterianos fueron extraídos del rizoplaneo de la raíz (según Nihorimbere y col, 2011), resultados inferiores a los reportados en la literatura de rizosferas consultadas.

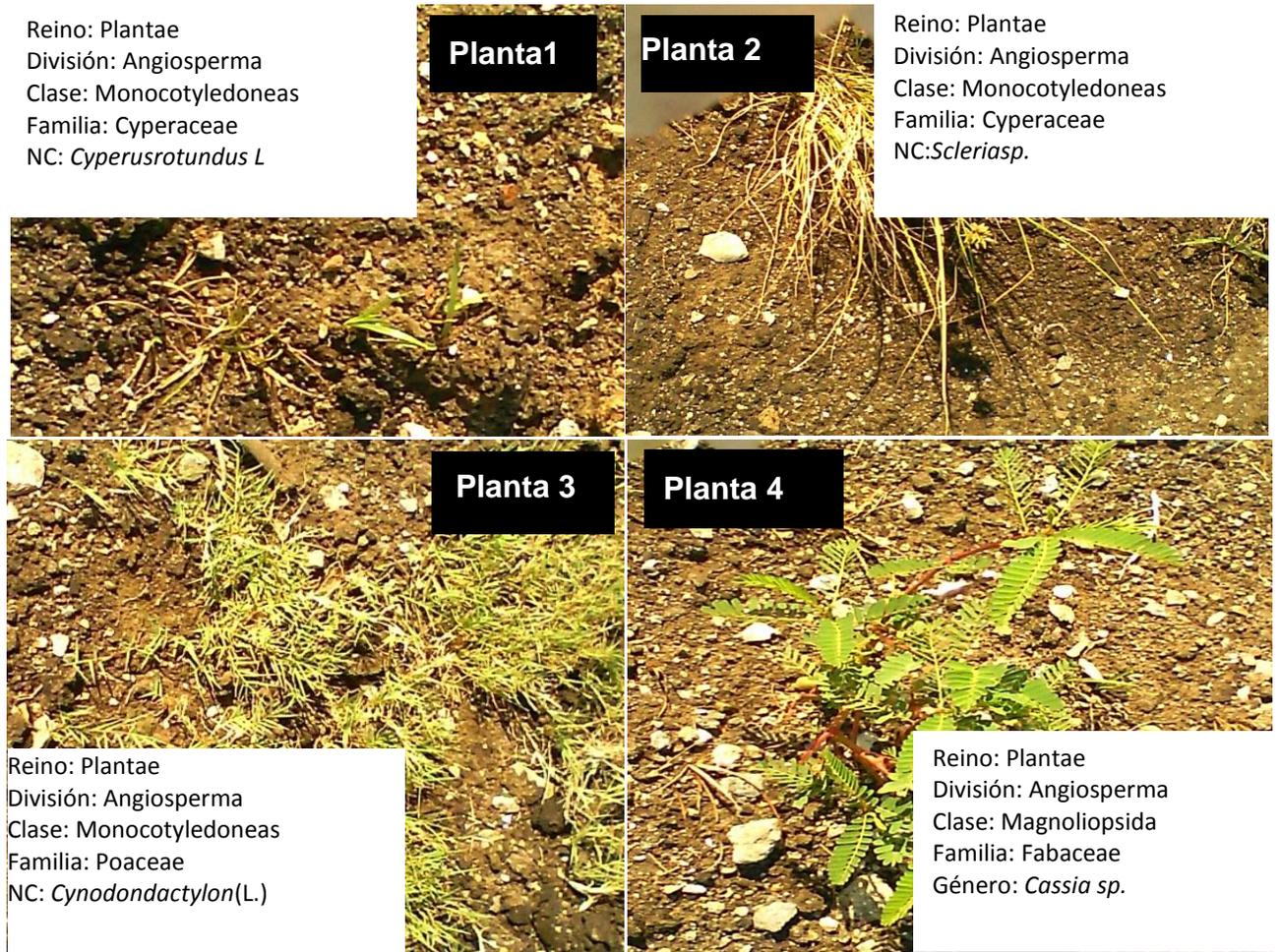


Figura III.2. Plantas muestreadas crecidas en medio ambiente contaminado.

La rizosfera es la zona del suelo más cercana a las raíces de las plantas, donde se alberga consorcios de microorganismos capaces también de degradar plaguicidas y provee un hábitat para un amplio rango de microorganismos.

El número bacteriano en la rizosfera frecuentemente excede los 10^9 células por gramo de peso seco del suelo, aproximadamente de 10-100 veces mayor que en el suelo no cultivable. Esto es debido a la presencia de nutrientes como: azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y otras pequeñas moléculas que se encuentran en los exudados de las raíces de las plantas que pueden constituir un tercio del carbono que es fijado por las mismas (Karthikeyan y col, 2004).

El procedimiento de aislamiento de rizobacterias condujo a la obtención de un total de 63 aislados bacterianos, los cuales fueron conservados en cuñas de agar nutriente a 4°C para usos posteriores.

III.2.1 Capacidad de las rizobacterias de crecer en medio mineral con clorofenoles como única fuente de carbono.

Para determinar la habilidad de crecer en diferentes compuestos clorofenólicos y elegir las de mejor comportamiento ante todos los compuestos ensayados, se realizó un screening utilizando ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, así como 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) (a $0,02 \text{ g.L}^{-1}$). De los 63 aislados de rizosfera ensayados, el 94 % (59 cepas) fueron capaces de crecer en 2,4-D, lo que sugiere que pueden degradar este compuesto para utilizarlo como fuente de carbono.

Tabla III.2. Conteo bacteriano de las soluciones obtenidas de las plantas crecidas en ambientes contaminados.

Planta	Concentración bacteriana (UFC/g de raíces)
<i>Cyperus torundus</i>	$2,6 \times 10^4$
<i>Scleria sp</i>	$5,0 \times 10^9$
<i>Cynodon dactylon</i>	$2,0 \times 10^5$
<i>Cassia sp</i>	$1,0 \times 10^7$

Los compuestos fenólicos son exudados por las raíces de las plantas. Los microorganismos capaces de usar estos compuestos como fuente de carbono, frecuentemente tienen las enzimas que pueden co-metabolizar contaminantes con similar estructura (Chaudhry y col, 2005). Muchos de los cuales como naringina, miricetina, catequina y otros, son liberados por las raíces de ciertas plantas y se ha demostrado que apoyan el crecimiento, ejemplo son las bacterias degradadoras de bifenilos policlorados (PCB) (Donnelly y col, 1994).

Algunos autores también han demostrado que el exudado de otros compuestos como los terpenos (e.j. α -pineno, α -terpineno entre otros) pueden actuar sobre la actividad de la enzima bifenil dioxigenasa en las bacterias degradadoras de PCB activándola o inhibiéndola (Singer y col, 2003).

Los resultados obtenidos mostraron que el 94 % de las bacterias aisladas de la rizosfera de plantas crecidas en ambiente contaminado con compuestos fenólicos, tienen la capacidad de crecer en clorofenoles como única fuente de carbono, lo cual pudiera explicarse por enzimas existentes, y/o a que la planta por sí misma, pueda también colaborar con la degradación de estos compuestos, aportando intermediarios que puedan por cometabolismo coadyuvar a la residencia en sus raíces en una microflora específica para la degradación de los compuestos tóxicos presentes en el hábitat donde viven.

La literatura plantea que existen dos rutas por la cual puede ser degradado el 2,4-D (Anexo III.2). La primera ruta (Anexo III.2a) involucra a la alfa-cetoglutarato dioxigenasa para dar lugar al 2,4-diclorofenol; mientras que la otra ruta (Anexo III.1b) comienza activando una dehalogenasa para formar el 4-clorofenoxiacetato, el cual se transforma en 4-clorofenol (Young E, 2011; Arora y Bae, 2014, Pieper y col, 2005). Lo anterior indica la necesidad de explorar si las bacterias que sean capaces de crecer en 2,4-D, a su vez crecen y utilizan alguno de los dos intermediarios principales de estas rutas, el 2,4-diclorofenol y el 4-clorofenol.

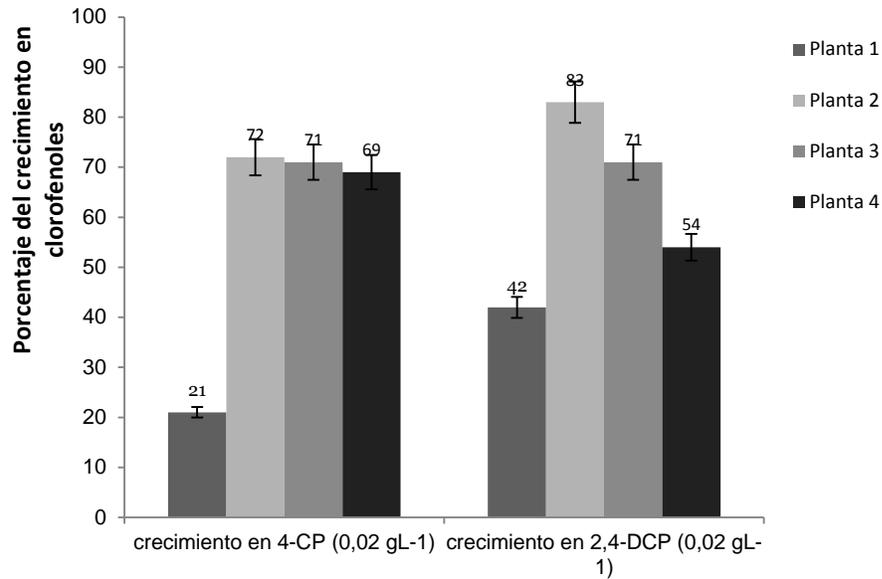
En el presente trabajo, se utilizaron ambos compuestos en medio mineral sin otra fuente de carbono para evaluar la capacidad de todos los aislados de crecer y por tanto utilizar estos compuestos como nutrientes.

Los resultados mostraron que 71 % (45) de las bacterias fueron capaces de crecer en 4-clorofenol o 2,4-diclorofenol, de ellas 49 % (31) pudieron crecer en ambos compuestos, indicando que pudieran activarse ambas vías metabólicas. Santoyo (2009) encontró que la *Burkholderia sp.*, estudiada en su trabajo, desarrollaba las dos rutas metabólicas propuestas por la literatura; tanto la del 4-CF como la del 2,4-diclorofenol cuando evaluó la degradación del 2,4-D.

El otro 22 % de las bacterias solo pudo crecer en alguno de estos compuestos, lo que indica que solo poseen o pueden activar una de las rutas metabólicas de degradación referenciadas.

El número y tipo de bacterias que se encuentran en diferentes suelos puede estar influenciada por las condiciones del mismo, incluyendo la temperatura, humedad y presencia de compuestos inorgánicos (sales) y orgánicos, así como por el número y el tipo de planta que crece en el mismo.

Los resultados evidencian que *Scleria sp* y *Cynodon dactylon* (plantas 2 y 3) son las que más aportaron en aislados rizobacterianos con capacidad de utilizar los clorofenoles en sentido general, aunque para el caso del 4-clorofenol no se apreciaron diferencias entre las plantas 2, 3 y 4 respecto a la planta 1 (Figura III.3). Lo encontrado coincide con lo planteado por Haichar y col (2008), al aportar evidencias de que las especies de plantas preparan a la comunidad bacteriana del suelo y que sus exudados seleccionan a las bacterias que conviven en sus raíces a partir de la comunidad del suelo en su totalidad.



Leyenda Planta 1 (*Cyperus rotundus*), planta 2 (*Scleria sp*), planta 3 (*Cynodon dactylon*), planta 4 (*Cassia sp*)

Figura III.3. Porcentaje de aislados bacterianos capaces de crecer en clorofenoles como única fuente de carbono por cada planta muestreada.

La actividad microbiana en la vecindad inmediata de la raíz ofrece un ambiente favorable para el co-metabolismo de los compuestos químicos unidos al suelo y recalitrantes.

Las transformaciones microbianas a veces son guiadas por la necesidad de reducir la toxicidad de estos compuestos, pero pueden sufrir una reducción en la energía necesaria para desarrollar estos procesos. Esta actividad puede ser ayudada por los compuestos energéticos que proporcionan los exudados de la raíz y que pueden hacer más eficiente la degradación de los compuestos recalitrantes (Chaudhry y col, 2005).

Lo anterior justifica el interés y el auge alcanzado en las investigaciones desarrolladas sobre la interrelación planta-microorganismos, lo que propicia el incremento de la biodegradación de compuestos tóxicos.

La mayoría de los estudios de rizobacterias se han concentrado en la diversidad de éstas (en número de bacterias y géneros) y generalmente a especies de cultivos puntuales, como lo refiere el trabajo de Wom-II y col (2011). Por otro lado se ha hecho mucho énfasis en los estudios de rizobacterias provenientes de suelos contaminados con metales pesados (e.j.cadmio) y su capacidad de tolerarlos (Melo y col, 2011; Croes y col, 2013).

A pesar que existen trabajos publicados sobre la capacidad de degradar compuestos orgánicos peligrosos por las rizobacterias aisladas de cultivos importantes económicamente desde 1995 (Anderson y col, 1995; Marihal y col, 2009; Dwivedi y col, 2010 y Chegini y col, 2015), Ahemad y Sahir (2011) plantearon que los datos que relacionan esta diversidad con el estudio de los niveles de tolerancia a los plaguicidas, son pocos, cuestión que limita el uso específico de estos en los procesos de biorremediación; sugiriendo dar continuación en esta área de investigación.

III.2.1. Características de promotoras de crecimiento vegetal de la rizobacterias aisladas.

Los microorganismos de rizosfera establecen relaciones no patogénicas con sus hospedadores que pueden incrementar su crecimiento y la resistencia a estrés biótico o abiótico. Algunos microorganismos proporcionan nutrientes directamente, como nitrógeno o fósforo, otros, los ponen en condiciones de ser utilizados, también los hay que producen sustancias promotoras del crecimiento (fitohormonas), etc. En base a estas propiedades, se les ha atribuido, en su conjunto, el acrónimo PGPR (del inglés, rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal). Aunque la mayoría de las interacciones positivas más importantes ocurren a nivel de raíz no hay que olvidar otras partes de la planta, como la filosfera, donde la abundancia de microorganismos es manifiesta (Gamalero and Glick, 2011).

Los mecanismos por los que los PGPR manifiestan su actividad, son varios y no del todo completamente conocidos. Ligada a la promoción del crecimiento aparece la producción de hormonas: auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno, etc. En relación con la protección frente a patógenos, puede detectarse antagonismos, producción de antibióticos, liberación de enzimas como chitinazas y glucanasas, que actúan sobre la pared de los hongos o cubiertas de los insectos, etc., además de la inducción de una resistencia sistémica, de toda la planta, a virus, bacterias y hongos. Y más directamente relacionadas con la nutrición, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato y otros nutrientes, la movilización de los mismos, etc. (Glick, 2012).

La promoción del crecimiento y desarrollo de las bacterias por medio de bacterias asociadas puede ocurrir por mecanismos directos e indirectos (Bonfante and Anca, 2009; Glick B, 2012). Los directos influyen en facilitar la adquisición de recursos como son los nutrientes, entre los se encuentran el nitrógeno, hierro y fósforo.

También puede ser modulando los niveles de fitohormonas. Dentro de los mecanismos indirectos se encuentran la producción de antibióticos y enzimas líticas, producción de etileno o induciendo la resistencia sistémica (Bonfante and Anca, 2009; Glick B, 2012).

En este trabajo, para dar seguimiento a esto, fueron seleccionadas las pruebas: producción de ácidos orgánicos y la capacidad de solubilizar el fosfato como mecanismos directos, así como producción de acetoína como mecanismo indirecto.

Los ensayos realizados mostraron que la aparición de las características de promotoras del crecimiento vegetal evaluadas difirió en las 4 plantas seleccionadas, indicando que la especie vegetal influye en la colonización y aparición de estas especies, a pesar de haber sido recogidas del mismo ambiente (Tablas III.3, III.4, III.5 y III.6). Se observó, además, que la característica menos frecuente de encontrar fue la producción de acetoína, y la más frecuente la capacidad de producir ácidos orgánicos, al obtener solo 5 aislados productores de la primera y 45 bacterias productoras de ácidos orgánicos.

La figura III.4, muestra los porcentajes de aislados obtenidos con algunas de las características de promotoras de crecimiento vegetal, destacándose la planta *Scleria sp.* (planta 2) con un 72% de aislados con características de producir ácidos orgánicos y 56% de aislados capaces de solubilizar fosfato; por su parte, *Cyperus rotundus* (planta 1) sólo aportó un 5% de aislados con características de producir acetoína, 63% de aislados con capacidad de producir ácidos orgánicos y 58% de aislados capaces de solubilizar fosfatos. Sin embargo, el 100% de los aislados obtenidos de la planta 3 (*Cynodon dactylum*) dieron positivo a los ensayos de solubilización de fosfatos.

Tabla III.3. Propiedades de promotores de crecimiento vegetal de los aislados de *Cyperus rotundus*.

Aislados	Producción Acetoína	Producción de ácidos orgánicos	Solubilización de fosfato (halo en cm)
40	-	+	0,1
41	-	-	-
42	-	+	0,3
43	-	-	-
44	-	-	-
45	-	+	0,1
46	-	+	-
47	+	-	0,5
48	-	+	0,1
49	-	-	-
50	-	+	0,4
51	-	+	0,1
52	-	+	0,1
53	-	+	0,1
54	-	+	0,1
55	-	+	-
56	-	+	0,2
57	-	-	-
58	-	-	-

Tabla III.4. Propiedades de promotores de crecimiento vegetal de los aislados de *Scleria sp.*

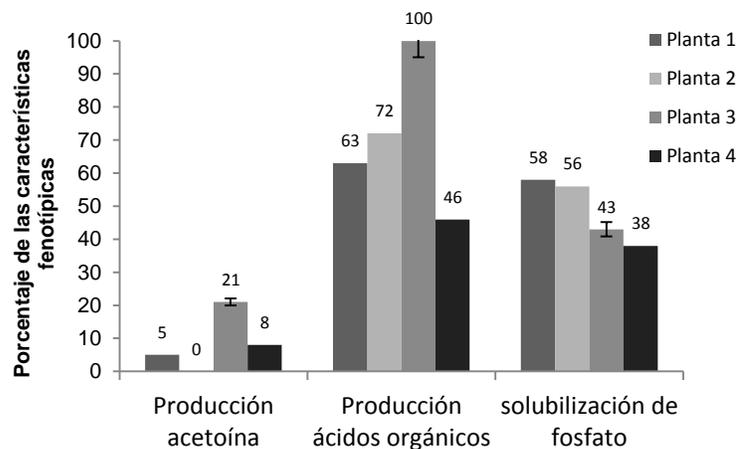
Aislados	Producción Acetoína	Producción de ácidos orgánicos	Solubilización de fosfato (halo en cm)
59	-	+	-
60	-	+	-
61	-	+	-
62	-	+	1,2
63	-	+	0,4
64	-	+	0,1
65	-	-	-
66	-	+	-
67	-	-	-
68	-	+	-
69	-	+	0,5
70	-	+	-
71	-	-	0,3
72	-	+	1,7
73	-	-	0,4
74	-	-	0,4
75	-	+	0,2

Tabla III.5. Propiedades de promotores de crecimiento vegetal de los aislados de *Cynodon dactylon*.

Aislados	Producción Acetoína	Producción de ácidos orgánicos	Solubilización de fosfato (halo en cm)
76	-	+	0,1
77	-	+	-
78	-	+	-
79	-	+	0,5
80	-	+	-
81	-	+	0,2
82	-	+	-
83	-	+	-
84	-	+	2,9
85	-	+	0,1
86	+	+	-
87	+	+	-
88	+	+	-
89	-	+	-

Tabla III.6. Propiedades de promotores de crecimiento vegetal de los aislados de *Cassia sp.*

Aislados	Producción Acetoína	Producción de ácidos orgánicos	Solubilización de fosfato (halo en cm)
90	-	+	-
91	-	+	0,3
92	-	+	-
93	+	+	0,4
94	-	+	-
95	-	-	1,2
96	-	-	-
97	-	-	0,7
98	-	-	-
99	-	-	-
100	-	+	0,3
101	-	-	-
102	-	+	0,7



Leyenda: Planta 1 (*Cyperus rotundus*), planta 2 (*Scleria sp.*), planta 3 (*Cynodon dactylon*), planta 4 (*Cassia sp.*).

Figura III.4. Porcentaje de los aislados bacterianos mostrando las características de promotoras de crecimiento vegetal por cada planta muestreada.

Varios autores han mostrado que las características de promover el crecimiento vegetal es típico de bacterias que crecen en las raíces de las plantas o en la zona de la rizosfera; explicando además que se desarrolla una interacción entre la planta y las bacterias que la rodean, donde las bacterias se benefician de muchos compuestos que la planta exuda y a la vez, las plantas también se benefician de los productos bacterianos excretados, así como de compuestos parcialmente metabolizados que se vuelven asequibles para ellas (Bonfante y Anca, 2009; Nihorimbere y col, 2011; Glick B, 2012).

Los resultados obtenidos en la determinación de las características de promotoras del crecimiento vegetal permitieron apreciar que *C. rotundus* y *Cassia sp* fueron las que menos aportaron en aislados con estas características, mientras que *Cynodon dactylon* fue la que más aportó.

De manera general, todas las plantas aportaron en bacterias solubilizadoras de fosfatos pero de la planta *C. dactylon* se aisló la mejor solubilizadora con un halo de 2,9 cm (aislado 84), seguida por *Scleria sp* con dos aislados con halos de 1,2 (aislado 62) y 1,7 cm (aislado 72) (Tabla III.4, III.5 y III.6).

En la agricultura el fósforo es el segundo nutriente luego del nitrógeno en términos de requerimientos cuantitativos para los cultivos. Este se encuentra en el suelo, plantas y microorganismos en ambas formas orgánica e inorgánica, pero solo una pequeña parte está disponible para las plantas debido a su fijación química y su baja solubilización.

En los suelos de la rizosfera estudiada, el contenido de nitrato es muy bajo, 3,82 mg.g⁻¹ de suelo mientras que el de fosfato es de 5,6 x 10⁻² mg.g⁻¹ de suelo, resultado que indica que no tiene concentración suficiente de nutrientes para que la población microbiana pueda asimilar y degradar los contaminantes clorofenólicos presentes en los suelos estudiados [epígrafe III.1.6]. El suelo objeto

de análisis está sometido continuamente a aportes de contaminantes de residuos industriales, pero no se tiene claridad sobre la fuente de aporte de fosfato (Obed,2015).

La deficiencia en fósforo es la mayor limitación para la producción agrícola y bajo ciertas condiciones los microorganismos ofrecen un sistema de rescate biológico capaz de solubilizar las formas insolubles de fósforo y hacerlo disponible para las plantas (Sindhu y col, 2010).

Típicamente, la solubilización del fósforo inorgánico ocurre a consecuencia de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el ácido cítrico y glucónico, los cuales son sintetizados por bacterias del suelo (Glick, 2012).

Se conocen otros ácidos orgánicos producidos por las bacterias como son oxálico, malónico, láctico, málico, 2-cetoglucónico, y otros (Paredes y Espinosa, 2010). No obstante la cantidad de ácidos orgánicos producidos, la solubilización del fosfato es más relacionada con la producción de los ácidos cítrico, glucónico y 2-cetoglucónico que con los otros, de ahí que aunque en el trabajo presentado se encuentre un gran número de bacterias productoras de ácidos orgánicos, no necesariamente esta característica está estrictamente relacionada con la solubilización del fosfato.

Se ha planteado en la literatura que la solubilización de fosfato es el resultado de la acidificación del espacio periplásmico, debido a la oxidación directa de la glucosa para formar los ácidos orgánicos (Paredes y Espinosa, 2010).

Por el contrario, otros autores ya habían planteado que los ácidos orgánicos producidos por las bacterias solubilizadoras no son determinantes en la solubilización y que el único factor determinante es la concentración de iones hidronios originados, que se producen en la respiración o en la asimilación de

iones amonio (NH_4^+) (Ilmer y Schinner, 1995), lo cual altera el pH del medio, lo suficiente, para movilizar minerales del suelo. En este trabajo se evaluaron las capacidades de producir ácidos orgánicos y solubilizar el fósforo insoluble.

Algunos agentes biocontroladores inducen un cambio sostenido en las plantas e incrementan su tolerancia a la infección contra patógenos bacterianos y fúngicos, un fenómeno conocido como Resistencia Sistémica Inducida. Varias rizobacterias patógenas tienen la habilidad de inducir este estado de resistencia en las plantas. Kloeper y col (2004) estudiaron este mecanismo en un *Bacillus spp* promotor del crecimiento vegetal, encontrando que la bacteria despertó la resistencia sistémica inducida en *Arabidopsis* mediante la producción de 2,3-butanodiol. Otra molécula que al igual que el 2,3-butanodiol induce esta resistencia es su derivado, la 3-hidroxibutanona, más conocida como acetoína (Young y col, 2011). En este trabajo se encontraron 5 aislados capaces de producir acetoína.

Se seleccionaron entonces 31 bacterias para posteriormente realizar ensayos de tolerancia y degradación a compuestos clorofenólicos, como el 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4-D. Basado en esta evaluación fueron seleccionados las bacterias que presentaban las tres características seguidas de las que presentaban dos.

De las 31 bacterias encontradas y que crecieron en ambos tipos de clorofenoles ensayados, se observaron las de crecimiento más abundante, seleccionando de ellas las que además coincidieron con las mejores promotoras de crecimiento vegetal. Atendiendo a esto, se seleccionaron 10 aislados que reunían ambas capacidades. Estas cepas se sembraron en una mayor concentración de 4-clorofenol ($0,08 \text{ g.L}^{-1}$) y 2,4-diclorofenol ($0,06 \text{ g.L}^{-1}$).

Todas las bacterias fueron capaces de crecer pero ocho de ellas mostraron mejor crecimiento (Tabla III.7).

Las bacterias fueron trasladadas a cuñas con igual medio y conservadas a 4°C para posterior evaluación de la degradación.

Tabla III.7. Capacidad de crecer en compuestos clorofenólicos a diferentes concentraciones como única fuente de carbono.

Cepa	4-CF (0,02g.L ⁻¹)	2,4-DCF (0,02 g.L ⁻¹)	4-CF (0,08 g.L ⁻¹)	2,4-DCF (0,06 g.L ⁻¹)
56	+++	+++	++	++
62	+++	+++	+	+
69	+++	++	++	++
72	++	++	++	++
79	++	++	++	++
81	++	++	++	++
84	++	++	++	++
88	++	++	+	+
100	++	++	++	++
102	++	++	++	++

Leyenda: + poco crecimiento, ++ buen crecimiento, +++exhuberante crecimiento.

Bacterias que fueron capaces de reunir ambas características buscadas (crecimiento en presencia de plaguicidas y compuestos fenólicos y propiedades de promotoras de crecimiento vegetal) han sido descritas por varios autores (Marihal y col, 2009; Chaudry y col, 2005 entre otros) siendo los compuestos mas referenciados el 2,4-D, pentaclorofenol, triclorofenol y 4-clorofenol, pero no se han encontrado hasta el momento referencias sobre la degradacion de 2,4-diclorofenol por rizobacterias. No obstante, Ahemad y Saghir (2011) referenciaron la tolerancia a fungicidas y herbicidas en cuya estructura química estaban el 4-clorofenol y 2,4-diclorofenol.

III.2.2. Características bioquímicas y morfológicas de los aislados de rizosfera y promotoras de crecimiento vegetal.

La microflora de la rizosfera incluye bacterias, hongos, nemátodos, protozoos, algas y algunos microartrópodos. De los microorganismos de suelo, el 98% no pueden ser cultivados. Su identificación, caracterización y descripción de su papel son particularmente difíciles. Recientemente las técnicas que analizan las moléculas de ADN y ARNr de muestras del suelo han revelado la enorme diversidad microbiana que habita en la rizosfera.

Muchos estudios sugieren que las Proteobacterias y las Actinobacterias conforman las poblaciones dominantes (>1%), usualmente mucho más encontradas en las rizosferas de diversas especies de plantas. Estos grupos contienen muchos miembros “cultivables” por eso son los más estudiados en la rizosfera y por tanto contienen la mayoría de los organismos investigados (Nihorimbere y col, 2011).

A partir de otros estudios realizados se ha publicado que las bacterias rizosféricas son predominantemente gram-negativas.

Se realizaron pruebas bioquímicas que permitieron plantear que las rizobacterias seleccionadas son todas Gram positivas, aerobias, la mayoría con forma bacilar

(6) y al menos tres mostraron presencia de esporas. Son todas proteolíticas y con capacidad de no sólo reducir el nitrato a nitrito, sino que algunas pueden reducir este último según se comprobó (Tabla III.8).

La prevalencia de éstas, se ha especulado se deba a sus habilidades para utilizar eficientemente los sustratos de crecimiento disponibles en la rizosfera y hacer frente mejor a los ambientes tóxicos debido a la presencia de enzimas detoxificadoras. Ejemplos hay descritos en la literatura de especies identificadas en la rizosfera como son *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Chaudhry y col, 2005). Weyens y col (2013), describieron en su trabajo que al aislar bacterias de las rizosfera de dos clones de sauce encontraron que los generos predominantes eran *Bacillus* y *Paenibacillus*.

Morgan y col, así como Bonfante y col exhiben en sus trabajos que los grupos bacterianos dominantes en la rizosfera son *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Bacillus*, los cuales a su vez son las promotoras de crecimiento vegetal más comunmente estudiadas y referidos en múltiples trabajos como degradadores de compuestos fenólicos (Morgan y col, 2005; Bonfante y Anca,2009; El-Sayed y col, 2009; Santacruz y col, 2005; Santoyo F, 2009).

En este estudio, aunque las pruebas ensayadas no son suficientes para designar un género de pertenencia de estas bacterias, se observaron características que conducen a una presunta identificación como bacterias pertenecientes al género *Bacillus sp.*

Tabla III. 8. Características fisiológicas de los aislados seleccionados.

Aislados		56	62	69	72	79	81	84	88	100	102
Gram		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Forma		b	c	nd	b	b	c	b	b	b	B
Producción esporas		nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	+	nd	+
HidrólisisCaseína		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Degradación de almidón		+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
Licuefacción de gelatina		+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
NO ₃ a NO ₂		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Acido de	Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Manitol	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
	Xilosa	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Crecimiento en NaCl	2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en Citrato		-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Producción de lecitinasa		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

III.3. Tolerancia de los aislados seleccionados a compuestos clorofenólicos.

La tolerancia de una bacteria a un compuesto muestra la capacidad que tiene para sobrevivir en presencia de este hasta una concentración determinada, es decir, el agente ensayado se comporta como bacteriostático, sin afectar la viabilidad, aunque sí el crecimiento, mientras que a concentraciones superiores puede comportarse como bactericida o bacteriolítico (Madigan y Parker, 2000).

En el presente estudio se determinó la tolerancia al 2,4-D y 2,4-diclorofenol para las 9 aislados rizobacterianos seleccionados. Para esto se ensayaron 9 concentraciones de los compuestos objeto de estudios que oscilaban entre 20 y 1000 mg.L⁻¹ (tabla III.9). Se obtuvo que en 2,4-D sólo el 55,6 % de los aislados toleraron 300 mg.L⁻¹, el 100% la concentración de 500 y 1000mg.L⁻¹. Sin embargo con el 2,4-diclorofenol, todos los aislados toleraron concentraciones de 20, 60 y 80 mg.L⁻¹, con un 100 % de tolerancia.

Los resultados alcanzados evidencian que el 2,4-diclorofenol resulta ser más tóxico que el 2,4-D, resultados que coinciden con los obtenidos por otros autores. (Ahemad, M. and Saghir, 2011) Todavía no está totalmente claro como estas bacterias toleran estas concentraciones, aunque el mecanismo de toxicidad referido en la literatura para los clorofenoles es la entrada a la célula y la reactividad con las biomoléculas celulares de los radicales fenoxi formados, a que pueden producir peroxidación de los lípidos de la membrana, daños a la membrana del retículo endoplasmático y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa con el transporte de electrones en la cadena respiratoria, con lo cual la respiración se detiene y el microorganismo muere.

Teniendo en cuenta lo anterior, los primeros mecanismos que pone en juego la bacteria es cambiar el comportamiento de la membrana para aumentar la rigidez de esta y disminuir su permeabilidad.

Tabla III.9. Tolerancia de aislados de rizobacterias a compuestos clorofenólicos.

Concentraciones ensayadas (mg.L⁻¹)	No. Cepas tolerantes (%)	
	2,4-D	2,4-DCP
20	-	9(100)
40	-	-
60	-	9(100)
80	-	9 (100)
100	5(55,6)	-
300	-	-
500	9(100)	-
800	-	-
1000	9 (100)-	-

Existen evidencias de cambios en el índice de insaturación de los ácidos grasos en los fosfolípidos de la membrana (Dercová y col, 2004), aumento en la saturación de la membrana mediante incremento de los ácidos grasos saturados o isomerizando los ácidos grasos de la forma cis a la trans (Murinová y Dercová, 2014).

Otro mecanismo que actúa, es el depósito en vesículas de membranas que después puede expulsar estos compuestos al exterior celular para las Gram negativas y producción de proteínas de estrés con función protectora además de la capacidad de esporular para las Gram positivas (Gren y col, 2012).

La literatura ha mostrado la tolerancia asociada a la capacidad de observar crecimiento, en los diferentes compuestos clorofenólicos, de varias bacterias como son: *Bacillus cereus* hasta 90 mg.L^{-1} de 2,4-diclorofenol (Matafonova y col, 2006, Matafonova y col, 2007); dos aislados de *Bacillus sp.* hasta 300 mg.L^{-1} de 2-clorofenol (Al-Thani y col, 2007), *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 hasta 300 mg.L^{-1} de 4-clorofenol, *B. cereus* y *Paenibacillus sp.*, entre $100\text{--}500 \text{ mg.L}^{-1}$ de fenol (Singh y col, 2009), así como *Pseudomonas sp* hasta 500 g.L^{-1} de fenol (Banerjee y Ghoshal, 2010). Lo anterior ejemplifica la relación que puede existir entre la complejidad de la estructura del compuesto y la capacidad de crecer en su presencia.

En estudios similares, las bacterias Gram negativas también han demostrado resistencia a otros pesticidas. Por ejemplo, las concentraciones máximas de tolerantes diferentes plaguicidas organofosforados para ambas cepas resistentes de especies de *Pseudomonas* y *Flavobacterium* aisladas de sitios contaminados fueron (250; 4000 y 8000) mgL^{-1} , respectivamente (Nazarian y Mousawi, 2005). Del mismo modo, *Rhizobium sp* específico para garbanzo han tolerado hasta $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ Juneja y Dogra (1978). Por otra parte, Boldt y Jacobsen (1998) también informaron de una variación en las MTLs de cepas de *Pseudomonas*.

Entre los herbicidas, metilsulfurón fue más tóxico en comparación con otros herbicidas y de toxicidad fue: metilsulfurón > clorsulfurón>metil-tifenilsulfurón. Esto indica que la variación en la tolerancia frente a los pesticidas para promotoras de crecimiento probablemente podría ser debido al hecho de que las rizobacterias adoptan diferentes estrategias para superar los efectos tóxicos de los pesticidas y estos mecanismos incluyen: biodegradación (Yang y Lee, 2008) y la hidrólisis enzimática (Dumas et al, 1989) de los pesticidas.

Los compuestos fenólicos tienen la habilidad de interrumpir las funciones de la membrana, produciendo la muerte celular (Lin y col, 2008). Su principal modo de acción es el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, aspecto en el cual también incide el grado de cloración, siendo este efecto mayor para los policlorados como el 2,4 diclofenol (Hägglom y Valo, 1995). También se ha mostrado que el crecimiento microbiano y la degradación de estos compuestos se dificulta por la toxicidad del sustrato cuando aumenta su concentración (Kargi y Eker, 2005).

Los mecanismos de resistencia a tóxicos han sido estudiados en detalles para los antibióticos y se piensa que la resistencia a compuestos orgánicos y solventes sea por mecanismos similares (Pandey y col, 2009). Varios autores sugieren que esta resistencia está basada en cambios morfológicos y fisiológicos. La toxicidad de los compuestos orgánicos se debe a su acumulación dentro de la membrana celular. El primer mecanismo desarrollado sería incrementar la rigidez de la membrana y disminuir su permeabilidad química.

Otro mecanismo puede ser expulsar el tóxico por medio de bombas dependientes de energía (transporte activo), cuyo objetivo es mantener la concentración del compuesto dentro de niveles subtóxicos para la especie (Pandey y col, 2009; Ramos y col, 2002; Chavez y col, 2006). Cualquiera de los mecanismos mencionados pudiera explicar tolerancia encontrada en los aislados rizobacterianos estudiados para el 2,4-D.

Los compuestos fenólicos tienen la habilidad de interrumpir las funciones de la membrana, produciendo la muerte celular (*Lin y col, 2008*). Su principal modo de acción es el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, aspecto en el cual también incide el grado de cloración, siendo este efecto menor para monoclorados como el 2-clorofenol y el 4-clorofenol, respecto a los policlorados como el pentaclorofenol, 2,4-DCF y el 2,4-D (*Hägglom y Valo, 1995*). También se ha mostrado que el crecimiento microbiano y la degradación de los compuestos fenólicos se dificulta por la toxicidad del sustrato cuando aumenta su concentración (*Kargi y Eker, 2005*).

III.4. Degradación de compuestos clorofenólicos por las rizobacterias seleccionadas promotoras del crecimiento vegetal.

Kwon y Yeon (2009) refieren que los microorganismos al crecer en fenol pasan por dos etapas, la primera, el microorganismo secreta enzimas que estimula la degradación de dicho compuesto, y la segunda ocurre por medio de cambios en la estructura de la membrana originado por el tóxico, lo que explica la demora en el comienzo de la degradación de éste y otros compuestos similares, lo que se considera como la adaptación del microorganismo a el compuesto.

En el presente estudio, para la determinación de la capacidad degradadora de compuestos clorofenólicos de las rizobacterias seleccionadas, se tomaron como compuestos referentes el 2,4-D a concentración de 200 mg.L⁻¹; en caso del 2,4-DCP, dado a la poca solubilidad la concentración en tiempo cero es variable (90-120 mg.L⁻¹) según se muestra en la Tabla III.10.

Todos los aislados bacterianos mostraron un crecimiento exponencial en un orden de 10⁻² UFC/mL en 96 h sobre 2,4-D como única fuente de carbono; tiempo a partir del cual se mantuvo la fase estacionaria hasta las 114h de experimentación (Figura III.5). Los aislados que mejor crecimiento mostraron fueron el 88, 79 y 56 con velocidad específica de crecimiento (μ) de 9,9.10⁻²; 9,3.10⁻² y 8,6.10⁻² h⁻¹, respectivamente.

Tabla III.10. Concentraciones de los aislados bacterianos seleccionados para el 2,4-DCP en los tiempos ensayados.

Aislados bacterianos	Concentración (mg.L ⁻¹)		
	t ₀	t ₁	t ₂
56	112,39	83,51	42,93
62	91,79	80,83	39,60
72	100,39	76,82	42,94
79	121,92	97,45	40,71
81	120,25	87,57	39,60
84	106,33	62,87	39,60
88	118,66	76,88	38,50
100	118,66	82,13	39,00
102	118,66	87,57	39,60

Leyenda: t₀-tiempo inicial, t₁- 114 h, t₂- 336 h

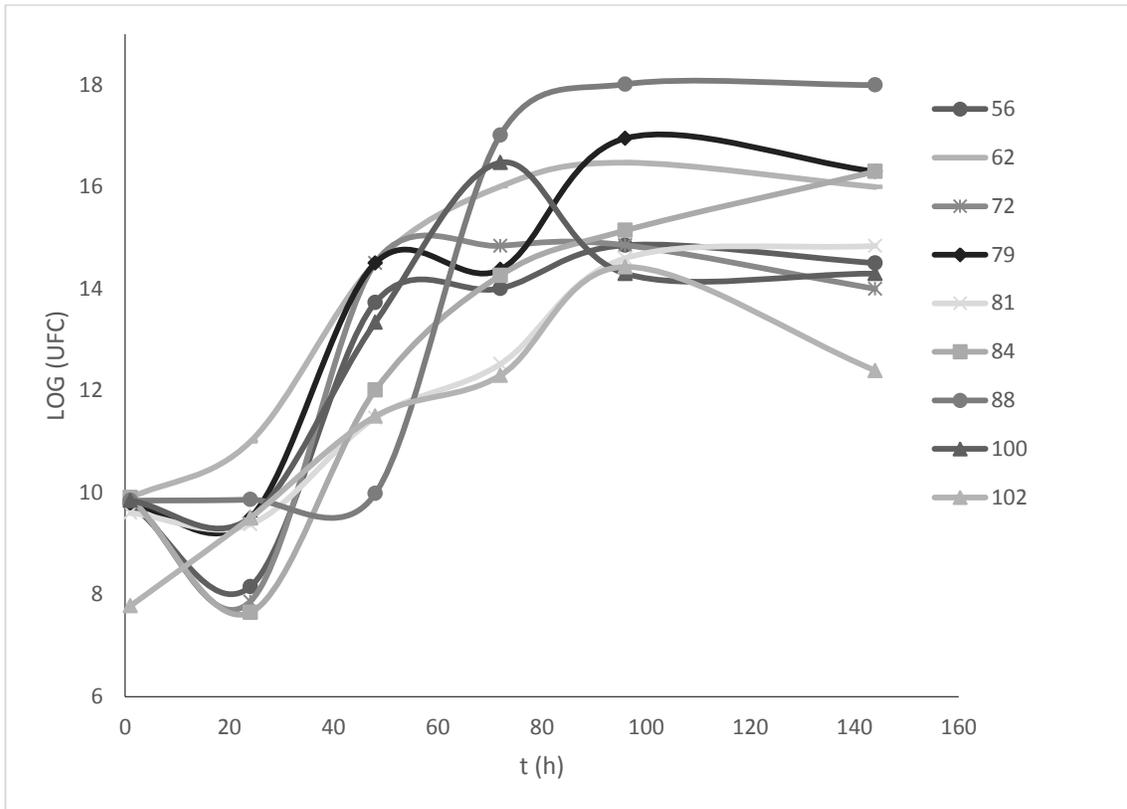


Figura III.5. Curva de crecimiento de los aislados rizobacterianos seleccionados crecidas en 2,4-D como única fuente de carbono.

Con respecto al crecimiento en 2,4-DCF; todos los aislados bacterianos mostraron crecimiento exponencial en un tiempo de 66 h; sin embargo el aislado (56) obtuvo un máximo exponencial a las 96 h con una velocidad específica de crecimiento de $9,30 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, ligeramente superior a la alcanzada frente al 2,4-D ($8,6 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$) (Figura III.6). De todos los aislados rizobacterianos, el 102, 56, 88, 81, 79 y 100 refieren las mejores velocidades específicas de crecimiento (μ) de $9,90 \cdot 10^{-2}$; $9,30 \cdot 10^{-2}$, $8,80 \cdot 10^{-2}$; $7,70 \cdot 10^{-2}$, $7,30 \cdot 10^{-2}$ y $6,92 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Los resultados evidencian que las 9 rizobacterias seleccionadas son capaces de crecer en ambos compuestos clorofenólicos ensayados, sin embargo muestran mejor crecimiento en 2,4-D que en 2,4-DCF. Los aislados 79, 88, 100 y 102 mantienen un comportamiento similar ante ambos compuestos. La degradación del 2,4-D a concentración de $200,0 \text{ mg.L}^{-1}$, reveló que a las primeras 24 h hay una disminución de la concentración con porcentajes de biodegradación que oscilan entre 27 y 35 %; transcurrido el tiempo total de experimentación (114 h) la biodegradación alcanzó porcentajes de 60 a 72 % (Figura III.7). Destacándose la rizobacteria 56 con un 72 % de degradación.

En 2,4-DCF, si bien las concentraciones ensayadas son inferiores a las realizadas con 2,4-D, las rizobacterias degradaron en menor cuantía el 2,4-DCF. Los aislados frente a 2,4-D, que mostraron, en orden descendente, % de degradación superior fueron: 88, 81, 100 y 102 con 67,1; 67,6; 66,8 y 66,6% respectivamente los cuales no difieren significativamente para un nivel de confianza del 95 % (Fig. III.8).

Al analizar el comportamiento del porcentaje de biodegradación de los aislados, mostraron que a las 114 h el aislado 88 (68%) para la concentración $38,50 \text{ mg.L}^{-1}$ y el aislado 81 (67%) $39,60 \text{ mg.L}^{-1}$. La experimentación demuestra que el aislado rizobacteriano (81) mostró mayor crecimiento pero además tiene un comportamiento de mayor porcentaje de biodegradación. Según el análisis estadístico, no existen diferencias significativas entre los porcentajes de degradación.

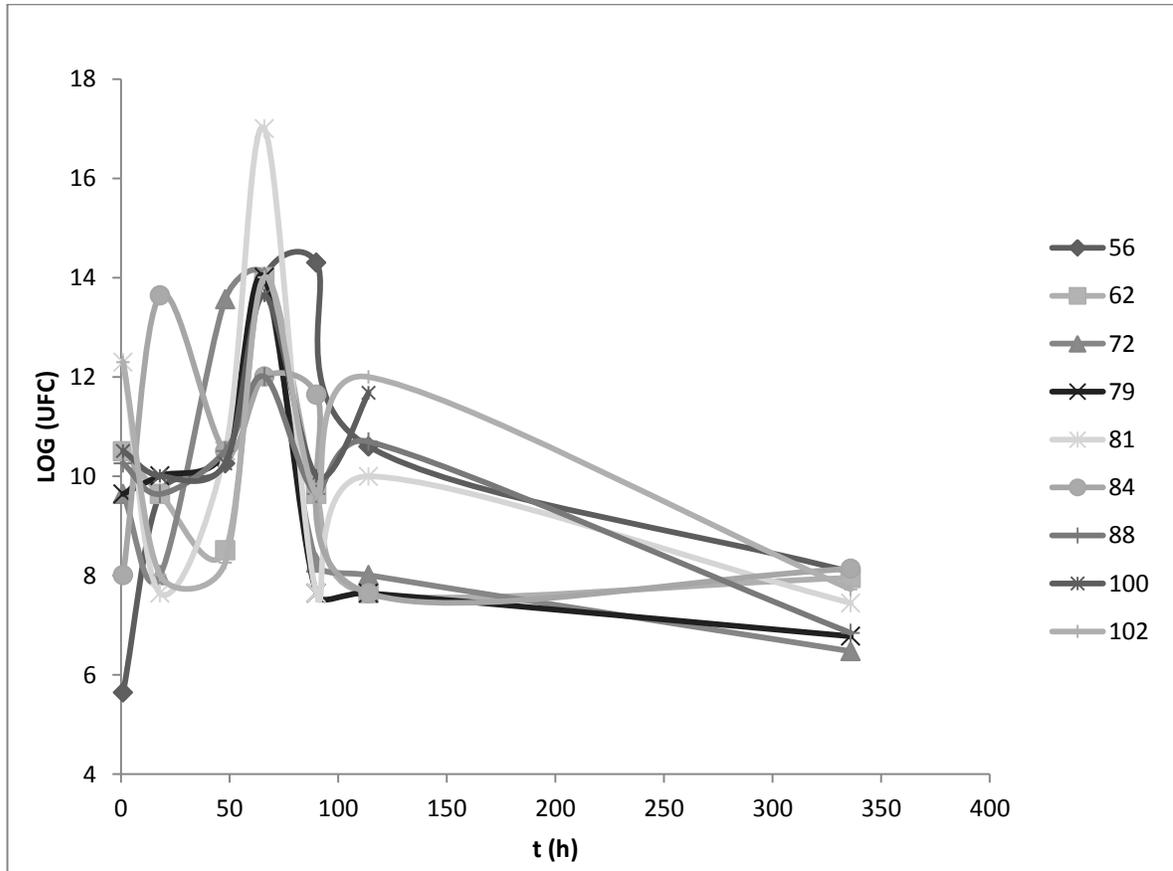


Figura III.6. Curva de crecimiento de los aislados rizobacterianos seleccionados crecidas en 2,4-DCF como única fuente de carbono.

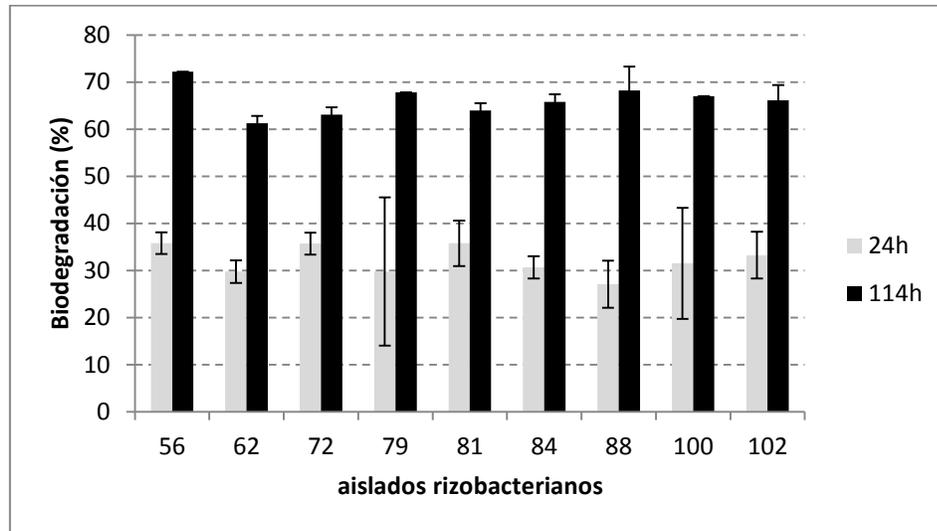


Figura III.7. Biodegradación de 2,4-D por los aislados rizobacterianos seleccionados.

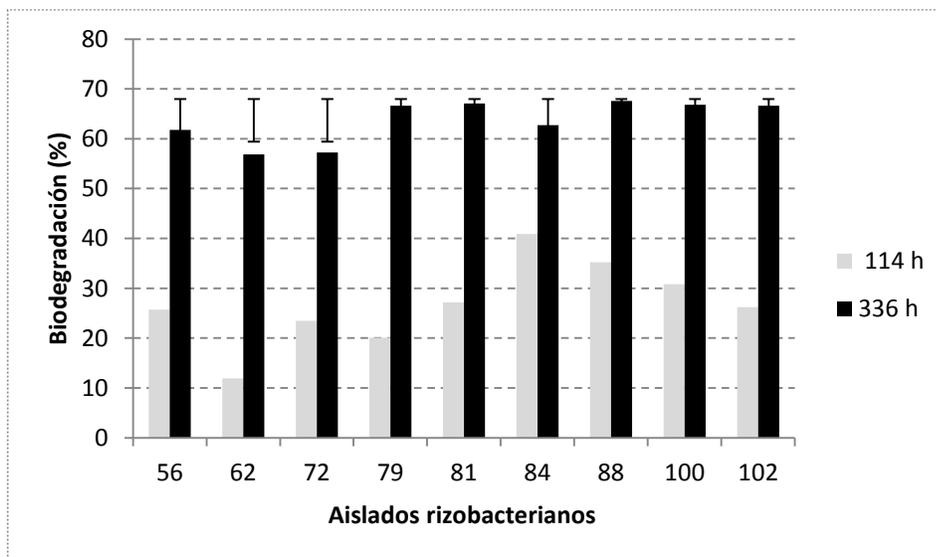


Figura III.8. Biodegradación de 2,4-DCP por los aislados rizobacterianos seleccionados.

La rizobacteria 56, aunque fue la segunda en mejor crecimiento sólo logra degradar el 2,4-D hasta un 62 %, inferior al logrado con 2,4-D.

Los resultados obtenidos difieren de los descritos por Santacruz y col, 2005, los cuales experimentaron con *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada y enfrentada a concentraciones hasta 0,5 g/L de 2,4-D, encontrando que los mayores valores de remoción (70 %) en tan solo 24 horas. Resultados similares a los de Santacruz y col encuentra Santoyo (2009), quien al evaluar una cepa de *Burkholderia sp.* Inmovilizada y enfrentada a concentraciones incrementadas de 2,4-D (0,1-0,35 g.L⁻¹) observó que al aumentar la concentración del compuesto fenólico, aumentaba también la velocidad de remoción por la bacteria. Esta misma autora evaluó esta bacteria en conjunto con otras formando un cultivo mixto, observando 100 % de remoción del herbicida (0,17 g.L⁻¹) en 13 horas. Cuando evaluó a *Burkholderia sp.* sola en un cultivo suspendido con 0,05 g.L⁻¹ de 2,4-D encontró 100 % de degradación a las 24 horas.

Por su parte, Fontmorin y col (2013), registran resultados que se acercan a los obtenidos en este experimento al ensayar 0,1 g.L⁻¹ del herbicida y encontrar que la degradación comenzaba a los siete días y transcurría completamente hasta los 14 días. Ellos emplearon un inóculo formado de lodo activado, obtenido de una planta de tratamiento de aguas residuales, a diferencia de estos aislados que fueron aisladas de rizosfera de plantas crecidas en suelos con contenido fenólico.

Los resultados logrados en este trabajo, apuntan a la posibilidad de contar con consocios o especies bacterianas puras con la capacidad de degradar el 2,4-D incluso a altas concentraciones, lo cual se contrapone con lo observado para el 2,4-DCP, apoyando la idea de Herrera y col (2008), que éste último debido a sus propiedades físico-químicas y la posición que ocupa el cloro en su estructura tiene una toxicidad mayor que el éster del diclorofenol. Aspecto confirmado por Santoyo cuando evaluó el comportamiento de las cepas integrantes del cultivo mixto

encontrando que las bacterias tenían mayor dificultad en degradar al 4-clorofenol y al 2,4-diclorofenol, lo cuales son los intermediarios de la degradación del 2,4-D, a diferencia de la capacidad de degradar al propio herbicida, todo lo cual apunta a la posibilidad de acumulación de estos intermediarios tóxicos en el ambiente.

CONCLUSIONES

1. Los suelos estudiados poseen baja aireación e insuficiente concentración de nutrientes para favorecer el desarrollo de la población microbiana.
2. Se obtuvieron 63 aislados de la rizosfera de 4 plantas. De estas el 93,6 % crecieron con 2,4-D y el 49,2 % en 2,4-DCF. El 82,5 % mostró características de promotoras del crecimiento vegetal. De estas el 16% (9) toleran concentraciones de 500 a 1000 mg.L⁻¹ para el 2,4-D y de 40 a 80 mg.L⁻¹ para el 2,4-DCF.
3. Se demostró que los 9 aislados rizobacterianos seleccionados con características de promotores de crecimiento vegetal tienen capacidad para degradar tanto el 2,4-D como el 2,4-DCF, siendo superior en 2,4-D.

RECOMENDACIONES

1. Completar las técnicas analíticas que conduzcan al conocimiento del proceso de degradación y poder identificar la ruta metabólica seguida por los microorganismos ensayados.
2. Clasificar hasta especie, mediante técnicas moleculares, a los aislados bacterianos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adetutu E.; Weberb J.; Aleer S.; Dandieb C.; Aburto-Medina A.; Ball A.; Juhasz A. Assessing impediments to hydrocarbon biodegradation in weathered contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 261, 847– 853.
- Ahemad, M. and Saghir, K. Assessment of pesticide-tolerance and functional diversity of bacterial strain isolated from rhizospheres of different crops. *Insight Microbiology*, 2011, 1(1): 8-19.
- Ahemad M, A Comparative Analysis of Tebuconazole Mediated Phytotoxicity to Legumes. *Journal of Environmental Science and Technology*, 2011, 4 (6), 630-637.
- Alexander, D. B; Zuberer D. A. Siderophore producing bacteria of iron-efficient and inefficient grass: 308. In D.L Keister and P. B. Crigan (eds). *The Rhizosphere and plant growth*. The Netherlands: Kluwer Academic Publisher.1991.
- Alexeiev, V. N. Análisis cuantitativo. 2^{da} Edición. Editorial MIR Moscú. 1978, pp 517
- Al-Thani R, Abd-El-Haleem D, Al-Shammri M. Isolation, biochemical and molecular characterization of 2-chlorophenol degrading *Bacillus* isolates. *African J of Biotechnol*. 2007,6(23):2675-2681.
- Álvarez A, Yañez ML, Benimeli CS, Amoroso MJ. Maize plants (*Zea mays*) root exudates enhance lindane removal by native *Streptomyces* strains. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012,. 66:14-18.
- Anderson TA, White DC, Walton BT. Degradation of hazardous organic compounds by rhizosphere microbial communities. En: *Biotransformation: Microbial degradation of health risk compounds*. Ved Pal Singh (ed). Elsevier Science. 1995. Pp 205-225.

- APHA. Standard Methods for the examination water and wastewater. 21th edition. American Press. Health Association. USA. 2005, 1350 p.
- Arora PK and Bae H. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13:31.
- Banerjee A, Ghoshal AK. Isolation and characterization of hyper phenol tolerant *Bacillus* sp. from oil refinery and exploration sites. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 176:85-91.
- Bergey DH, Holt JG. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9th edition. Ed. Hensyl WR. Lippincott Williams & Wilkins, New York: 1994.
- Bobadilla, C. y Rincón, S.C. Aislamiento y producción de bacterias fosfatos solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Microbiologo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 2008. Pág. 16.
- Boldt, T. and Jacobsen, C. Different toxic effects of the sulfonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent pseudomonads isolated from an agricultural soil. *FEEMS Microbiology Letter*, 1998, 161(1): 29-35
- Bonfante P and Anca I. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. 2009. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:363–83.
- Botré C, Botré F, Mazzei F, Podestá E. Inhibition-based biosensors for the detection of environmental contaminants: determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. 2009. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19:2876-2881.
- Chaudhry MQ, Schroeder P, Werck-Reichhart D, Grajek W y Marecik R. Prospects and limitations of phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment.. *Environmental Science and Pollution Research*. 2002, 9 (1): 4–17.

- Chaudhry Q, Blom-Zandstra M, Gupta S, Joner E. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Plant-Microbial Interactions*, 2005, 12(1):34-48.
- Chavez C, et al.) Analysis of strains with mutations in six genes encoding subunits of the V-ATPase: eukaryotes differ in the composition of the V0 sector of the enzyme. *J Biol Chem*. 2006, 281(37):27052-62
- Chegini S, Sani B and Hassan H. The Effect of *Pseudomonas* Bacteria on maize growth and atrazine biodegradation in soil. *Biological Forum – An International Journal*, 2015, 7(1): 951-956.
- Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E.A. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and environmental microbiology*, 2005,71(9): 4951–4959.
- Croes S, Weyens N, Janssen J, Vercampt H. Colpaert JV, Carleer R and Vangronsveld J. Bacterial communities associated with *Brassica napus* L. grown on trace element-contaminated and non-contaminated fields: a genotypic and phenotypic comparison.. *Microbial Biotechnology*, 2013, 6(4): 371–384 .
- Cunningham J and Kuiack C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. 1992. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 1451–1458.
- De Almeida Andrade J.; Augusto F. Sales Fontes Jardim I. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética química*, 2010, Volume 35, número 3.
- De Salmone, I. E. G.; Hynes, R. K.; Nelson, L. M. Cytoquinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001, 47(5):404-411.

- Debarati P, Gunjan P, Janmeja y P, Rakesh KJ. Accesing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *TRENDS in Biotechnology*, 2005, 23 (3):135-142.
- Dercova K, Certik M, Malova A, Sejaková Z. Effect of chlorophenols on the membrane lipids of bacterial cells. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2004, 54: 251-254.
- Dey, R.; Pal, K.K.; Bhatt, D.M. Y Chauhan, S.M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 2006, 159: 371—394.
- Dibut, B. Obtención de un bioestimulador del crecimiento y el rendimiento vegetal para el beneficio de la cebolla (*Allium cepa* L.). La Habana. Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2000.
- Donnelly PK, Entry JA y Crawford DL. Degradation of Atrazine and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by Mycorrhizal Fungi at Three Nitrogen Concentrations. *Applied Environmental Microbiology*, 1993, 59 (8):2642-2647.
- Dwivedi S, Singh BR, Al-Khedhairi AA, Alarifi S and Musarrat J. Isolation and characterization of butachlor-catabolizing bacterial strain *Stenotrophomonas acidaminiphila* JS-1 from soil and assessment of its biodegradation potential. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 51: 54–60.
- El-Sayed W, Ismaeil M, El-Beih F. Isolation of 4-chlorophenol degrading bacteria *Bacillus subtilis* OS1 and *Alcaligenes* sp OS2 from petroleum oil-contaminated soil and characterization of its catabolic pathway. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2009, 3(2):776-783.

- Farrell A, Quilty B. Substrate-dependent autoaggregation of *Pseudomonas putida* CP1 during the degradation of monochlorophenols and phenol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.2002, 28:316-324.
- Fontmorin JM, Fourcade F, Geneste F, Floner D, Huguet S et al. Combined process for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid treatment-coupling of an electrochemical system with a biological treatment. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 70:17-22.
- GAMALERO, E. and GLICK, B. *Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria*. D.K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*, DOI 10.1007/978-3-642-21061-7_2, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.
- Gemini V, Gallego A, Fortunato MS, Rossi S, Gómez CE y col. Degradación de 2,4 diclorofenol por una comunidad bacteriana autóctona. Trabajos presentados en Jornada de Toxicología. Buenos Aires. 2002.
- Ghassemi ML, Fargo P. Painte, S, Quinlivan R, Scofield y Takata A. Environmental Fates and Impacts of Major Forest Use Pesticides.. *EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances*. 1981, pp. 101-148.
- Glick BR. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012, Article ID963401:1-15.
- Gómez Romero S.E.; Gutiérrez Bustos D; Hernández Marín A. Hernández Rodríguez C.; Losada Casallas M. Mantilla Vargas P. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. NOVA-Publicación Científica EN *Ciencias Biomédicas*, 2008, 6(9) ENERO – JUNIO.

- González, A.; Lacasa, A.; Rodríguez, R.; Fernández, J. A.; Franco, J. A.. Rizobacterización de plántulas de pimiento: influencia en la fase de semillero y en la producción del cultivo. *Agrícola Vergel*, 2000, pp. 727-735.
- Gordon, S.A. and Weber, R.A. Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant Physiol*, 1951, 26: 192-195.
- Gren I, Hupert-Kocurek K, Osiecka M, Guzik U, Wojcieszynska D. Toxicity of 4-chlorophenol under cometabolic conditions depending on the bacterial cell wall structure? *Architecture Civil Engineering Environment*, 2012, 3: 101-107.
- Häggblom MM, Young, LY. Anaerobic degradation of halogenated phenols by sulfate-reducing consortia. *Appl. Environ. Microbiol*, 1995, 61:1546-1550.
- Haichar, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J, Heulin T and Achouak W . Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*, 2008, 2:1221–1230.
- Hebbar, K. P.; Martel, M. H.; Heulin, T. 1998. Suppression of pre and post emergence damping off in corn by *Burkholderia cepacia* Eur. *J. Plant. Pathol*, 1998, 104:29-36.
- Hernández, A.; Caballero, A.; Pazos, M.; Ramírez, R.; Heydrich, M. 2003. Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo del maíz (*Zea mays* L.) en diferentes suelos de Cuba. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2003, (CO) V (1): 45-55.
- Herrera Y, Okoh AI, Álvarez L, Robledo N, Trejo-Hernández MR. Biodegradation of 2,4-dichlorophenol by *Bacillus* consortium. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24:55-60.

- Hubert C, Shen Y, Voordow G. Composition of toluene-degrading microbial communities from soil at different concentrations of toluene. *Appl. Environ. Microbiol*, 1999, 65:3064-3070.
- Jackson, M. L. Análisis químico de los suelos. Edición Revolucionaria. Instituto del Libro. Cuba. 1979. pp 70 – 481.
- Juneja S., Dogra R.C., Effect of aldrin on growth and oxidative metabolism of rhizobia. *J. Appl. Microbiol*, 1978,44 (1978), pp. 107–115
- Kala S. Rhizoremediation: A Promising Rhizosphere Technology. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 2014, 8 (8): 23-27.
- Kargi F, Eker S. Removal of 2, 4-dichlorophenol and toxicity from synthetic wastewater in a rotating perforated tube biofilm reactor. *Process Biochemistry*, 2005, 40 (6), 2105-2111.
- Karlen, D. L., Mausbach, M. J., Doran, J. W., Cline, R. G., Harris, R. F., & Schuman, G. E. Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation (a guest editorial). *Soil Science Society of America Journal*, 1997, 61(1), 4-10.
- Karthikeyan R, Davis LC, Erickson L, Al-Khatib K, Kulakow P, Barnes P, Hutchinson P. Potential for plant-based remediation of pesticides contaminated soil and water using nontarget plants as trees, shrubs and grasses. *Critical Review in Plant Science*, 2004, 23(1): 91-101.
- Kloepper JW, Ryu ChM, Zhang S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp.* *Phytopathology*, 2004, 94 (11): 1259-1266.
- Kristiansen NK, Froshaug M, Aune KT, Becher G, Lundades E. Identification of halogenated compounds in chlorinated sea water and drinking water produced offshore using n-pentane extraction and open-loop stripping technique.. *Environ. Sci. Technol*, 1994, 28:1669-1673.

- Kröckel L, Focht D. Construction of Chlorobenzene-utilizing recombinants by progenitive manifestation of a rare event. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53(10): 2470-2475.
- Lin J, Reddy M, Moorthi V, Qoma BE.. Bacterial removal of toxic phenols from an industrial effluent. *African J of Biotechnol*, 2008, 7(13):2232-2238.
- MacNaughton SJ, Stephen JR, Venosa AD, Davis GA, Chang YJ y col. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *App. Environ. Microbiol*, 1999, 65:3566-3574.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. “*Brock Biology of Microorganisms*”. 9na edition. Ed Prentice Hall. 2000; Cap 2. Pp.60.
- Marihal AK, Jagadeesh KS and Sinha S. Biodegradation of PCP by the rhizobacteria isolated from pPentachlorophenol-tolerant crop species. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 2009, 27:513-517.
- Maroto Arroyo ME, Rogel Quesada JM. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y Aguas contaminadas por hidrocarburos. MMWR. URL disponible en: <http://aguas.igme.es/igme/publica/pdf/lib15/028.pdf>, 2005.
- Matafonova G, Shirapova G, Zimmer Ch, Giffhorn F, et al. Degradation of 2,4-dichlorophenol by *Bacillus* sp. Isolated from an aeration pond in the Baikalskpulp and paper mill (Russia). *International Biodeterioration and Biodegradation.*, 2006, 58:209-212.
- Matafonova G, Shirapova G, Zimmer Ch, Kohring G, et al. *Bacillus cereus* is a microbial decomposer of 2,4-dichlorophenol. *Biology Bulletin*, 2007, 34(5):442-445.
- Melo MR, Flores NR, Murrieta SV, Tovar AR, Zuñiga AG, Fernández OF, Mendoza AP, Pérez NO, Dorantes AR. Comparative plant growth

promoting traits and distribution of rhizobacteria associated with heavy metal in contaminated soils. *Int J Environ Sci Tech*, 2011, 8(4):807-816.

- Morgan JA, Bending GD, White PJ. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J Exp Bo*, 2005, 56:1729-1739.
- Mulbry W y Kearney PC. Degradation of pesticides by microorganisms and the potential for genetic manipulation. *Crop Protection*, 1991, 10:334–346.
- Mullison, Wendell R. 1987. Environmental Fate of Phenoxy Herbicides. En *Fate of Pesticides in the Environment*. Biggar, James W. and James N. Seiber, Eds. Agricultural Experiment Station, Division of Agricultural and Natural Resources, University of California. Publication 3320. 1987.
- Murínová S, Dercová K. Response mechanisms of bacterial degraders to environmental contaminants on the level of cell walls and cytoplasmic membrane. *International Journal of Microbiology*, 2014, In <http://dx.doi.org/10.1155/2014/873081>
- Nanda kumar, R.; Babu, S.; Viswanathan, R.; Raguchander, T.; Samiyappan, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry*. 2001, 33(4-5): 603-612.
- Nápoles-Álvarez, J; Rodríguez-Pérez S.; Santiago-Blásquez L.; Ábalos-Rodríguez A. Disminución del extracto orgánico total en suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Tecnología Química*, 2015, XVII: 342-355.
- Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 1999, 170(1): 265-270.

- Nazarian, A. and Mousawi, M. Study of bacterial resistance to organophosphorous pesticides in Iran. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 2005. 2(3):207-211.
- Nihorimbere V, Ongena M, Smargiassi M, Thonart P. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 2011, 15(2):327-337.
- OBED, Y. Aislamiento de bacterias a de suelos contaminados con capacidad de crecer en hidrocarburos y 2,4 diclorofenol. *Tesina de Diplomado en Biodegradación de Xenobióticos*. CEBI, Universidad de Oriente, 2015. Oh y col, 2003
- Pandey G, Dorrian SJ, Russell RJ, Oakeshott JG. Biotransformation of the neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiamethoxam by *Pseudomonas* sp.1G. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009 Mar 13;380(3):710-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.156.
- Parales RE, Haddock JD. Biocatalytic degradation of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnology*, 2004, 13:249-252.
- Paredes M, Espinosa D. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: Una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 2010, 28 (1): 61-70.
- Patten, C. and Glick, B. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 3795-3801.
- Pérez Silva, Rosa María; Camacho Pozo, Miladis I.; Gómez Montes de Oca, José Manuel; Ábalos Rodríguez, Arelis; Viñas, M.; Cantero Moreno, Domingo. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 39, núm. 1, enero-abril, 2008, pp. 44-51. Centro Nacional de Investigaciones Científicas de Cuba.

- Perkins EJ, Gordon MP, Caceres O, Lurquin PF. Organization and sequence analysis of the 2,4 dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *J. Bacteriology*, 1990, 172:2351-2359.
- Pieper D. Aerobic degradation of polychlorinated biphenils. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005; 67:170-191.
- Pons-Jiménez M.; Guerrero-Peña A.; Zavala-Cruz J.; Alarcón A. Extracción de hidrocarburos y compuestos del petróleo en suelos. Universidad y Ciencia, *Trópico Húmedo*, 2011, 27(1):1-15.
- Prakash V, Saxena S, Sharma A, Singh S, Singh SK Treatment of Oil Sludge Contamination by Composting. *J Bioremed Biodeg*, 2015, 6: 284. doi:10.4172/2155-6199.1000284
- Ramos JL1, Duque E, Gallegos MT, Godoy P, Ramos-Gonzalez MI, Rojas A, Teran W, Segura A. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2002, 56:743-68. Epub 2002 Jan 30.
- Rives, N.; Hernández, A.; Heydrich, M.; Rodríguez, A. J.; Manzano, J. Bacterias asociadas al arroz como una alternativa en la búsqueda de la sustentabilidad agrícola. IV Taller de la Cátedra de Medio Ambiente, 2003.
- Rivieros, J.A. Evaluación de microorganismos con potencial en rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*, 2008, 20(1): 37-48.
- Rogers K, Gerlach C. A status report on biosensors for ecological and human exposure assessment. *Environ. Sci. Technol*. 1996; 30:486-491.
- Romick and Fleming Acetoin production as an indicator of growth and metabolic inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of applied microbiology*, 1997, 84: 18-24.

- Sankaralingam S, Nithyanand P, Karuthapandiyan ST, Palavesam A, Ramasubburayan R, Immanuel G. Identification and growth characterization of a novel 2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid) degrading bacterium *Maribacter sp* AMSU isolated from aquaculture effluent. *Applied Ecology and Environmental Research*, 2013, 11(1): 137-151.
- Santacruz G, Bandala ER, Torres LG. Chlorinated pesticides (2,4-D and DDT) biodegradation at High concentrations using Immobilized *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 2005; 40:571–583.
- Santoyo F. El papel central de *Burkholderia sp*. En la degradación del herbicida 2,4-D, por un cultivo mixto inmovilizado en un reactor de lecho fijo. Tesis para obtener grado de Doctor en Ciencias Químicasbiológicas. México. 2009.
- Short KA, Doyle JD, King RJ, Sedler RJ, Stotzky G and Olsen RH. Effects of 2,4-dichlorophenol, a metabolite of a genetically engineered bacterium, and 2,4-dichlorophenoxyacetate on some microorganism-mediated ecological processes in soil. *App. Environ Microbiol*, 1991, 57(2):412-418.
- Short PL. Growing agchem R&D. *Chemical and Engineering News*. 2005; (83): 19–23.
- Sindhu S, Dua S, Verma MK, Khandel MA. Cap 9: Growth promotion of legumes by inoculation of rhizosphere bacteria. En: *Microbes for legume improvement*. MS Khan y col (eds), Springer-Verlag. 2010:195-235.
- Singer AC, Crowley DE, Thompson IP. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends Biotechnol*, 2003, 21: 123-130.

- Singh S, Bahadur B, Chandra R. Biodegradation of phenol in batch culture and mixed strains of *Paenibacillus sp* and *Bacillus cereus*. *Polish J of Microbiol*. 2009, 58(4):319-325.
- Singleton I. Microbial metabolism of xenobiotics: Fundamental and applied research. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1993;59:9-53.
- Veenagayathri K and Vasudevan N. Ortho and meta cleavage dioxygenases detected during the degradation of phenolic compounds by a moderately halophilic bacterial consortium. *International Research Journal of Microbiology (IRJM)*. 2011, .2(10): 406-414.
- Vessey, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 2003, 255: 571–586.
- Walker AE, Holman RE y Leidy RB. ELISA and GC/MS analysis of pesticide residues in North Carolina. *Journal of the American Water Resources Association*, 2000, 36:67-74.
- Weyens N, Beckers B, Schellingen K, Ceulemans R, Croes S, Janssen J, Haenen S, Witters N and Vangronsveld J. Plant-associated bacteria and their role in the success or failure of metal phytoextraction projects: first observations of a field-related experiment. *Microbial Biotechnology*, 2013, 6(3):288-299.
- Wilson Rd, Geronimo J, Armbruster JA. 2,4-D dissipation in field soils after applications of 2,4-D dimethylamine salt and 2,4-D 2 ethylhexyl ester. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 16:1239-1246.
- Wom-II K, Kyong W, Su-Nam K, Hyosub C, Kyoung-Yul R, Jong-Cul Y, Chang-Seuk P. Genetic diversity of cultivable plant growth-promoting rhizobacteria in Korea. *J Microbiol Biotechnol*, 2011, 21 (8):777-790.

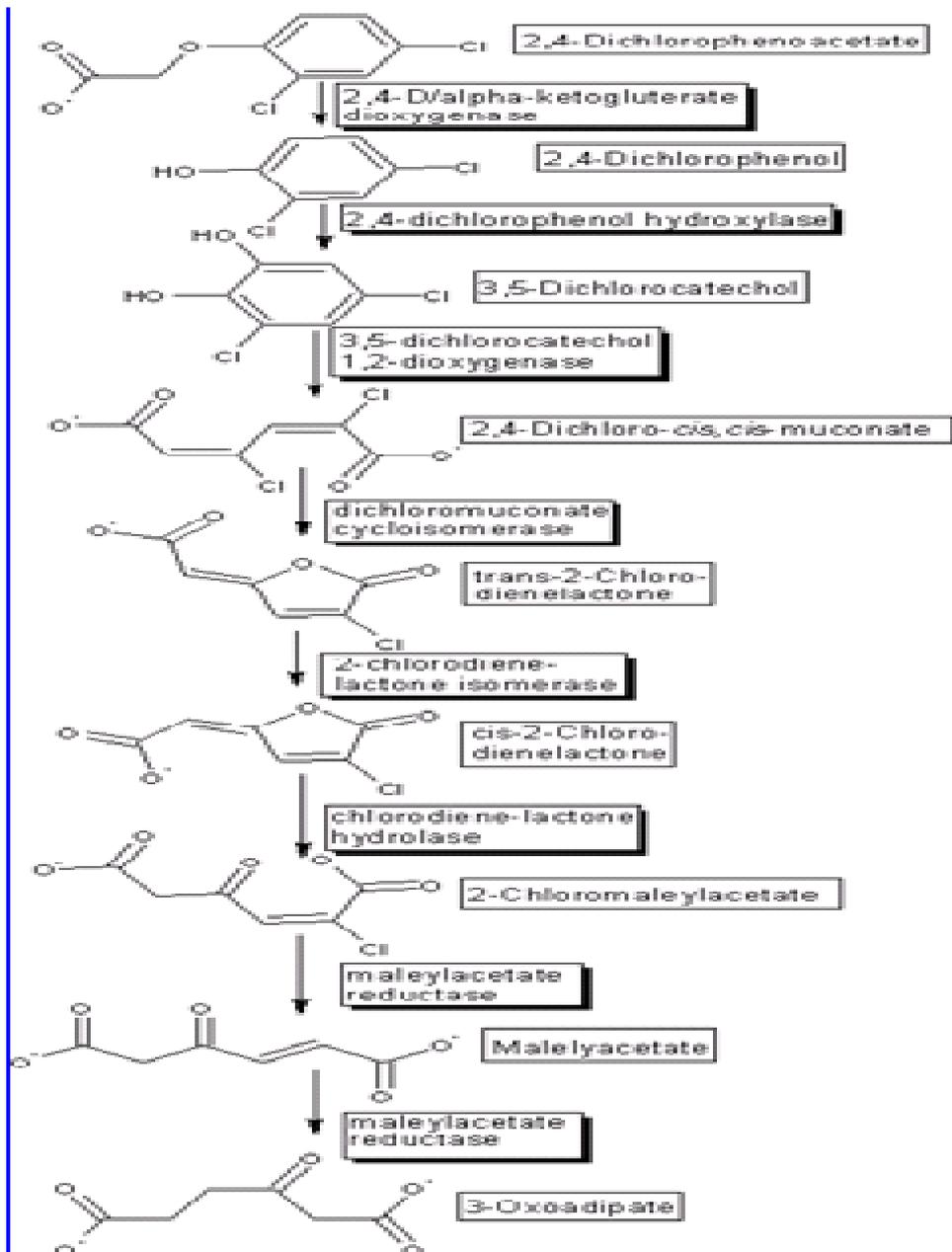
- Xie G, Cui Z, Yu J, Yan J, Hai W, Steinberger Y. Identification of nif genes in N₂-fixing bacterial strains isolated from rice fields along the Yangtze River Plain. *Journal of Basic Microbiology*, 2006, 46: 56-63.
- Yang C., Lee C. Enrichment, isolation, and characterization of 4-chlorophenol-degrading bacterium *Rhizobium* sp. 4-CP-20. *Biodegradation*, 2008, 19, pp. 329–336.
- Yen Chun-hsiang. Catalytic wet air oxidation of 2,4-dichlorophenol solutions with addition of Mn/1-Al₂O₃. Master's thesis. *Environmental Engineering. National Taiwan University*. 2000.
- Young K, Leveau J, Mcspadden B, Pierson E, Ryu Ch. The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria. *App Env Microbiol.* 2011, 77 (5): 1548-1555.

ANEXOS

Bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal con capacidad de degradar compuestos clorofenólicos.

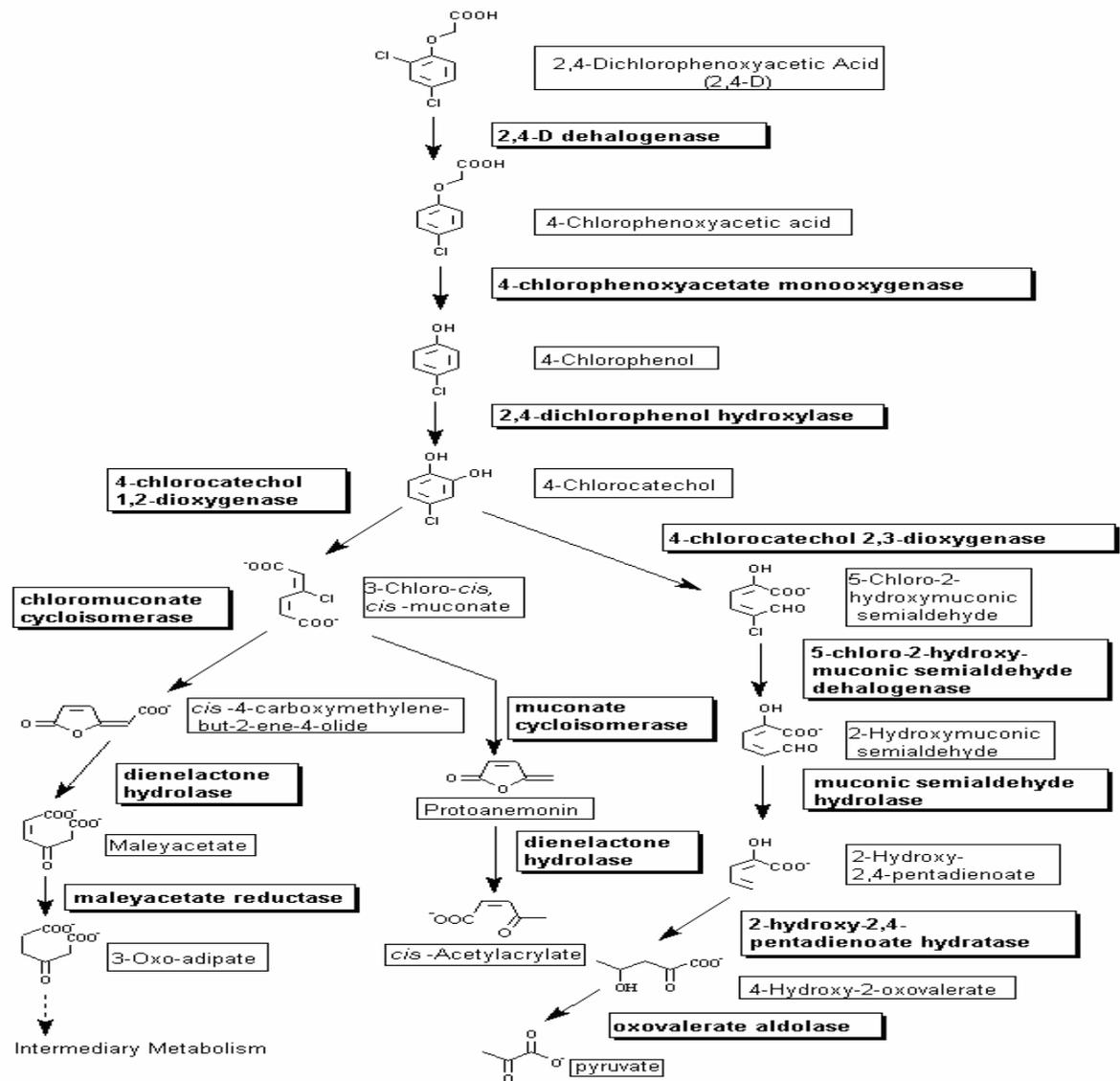
<p align="center">BIOECO HERBARIO DEL CENTRO ORIENTAL DE ECOSISTEMAS Y BIODIVERSIDAD (BSC)</p> <p><i>Muestra 2</i></p> <p>No. _____</p> <p>Nombre científico <i>Sidaea sp</i></p> <p>Nombre vulgar <i>ortadón</i></p> <p>Familia <i>Cipercaceae</i></p> <p>Localidad <i>Stgo de Cuba</i></p> <p>Prov. <i>Stgo de Cuba</i> Coord. _____</p> <p>Leg. <i>Lidieska Meriño Reyes</i></p> <p>Fecha <i>1-3-2016</i> Hábito _____</p> <p>Formación vegetal _____</p> <p>Sustrato _____</p> <p>Fenología _____</p> <p align="right">Det. <i>Lidieska Meriño Reyes</i></p>	<p align="center">BIOECO HERBARIO DEL CENTRO ORIENTAL DE ECOSISTEMAS Y BIODIVERSIDAD (BSC)</p> <p><i>Muestra 4</i></p> <p>No. _____</p> <p>Nombre científico <i>Cassia sp</i></p> <p>Nombre vulgar <i>son</i></p> <p>Familia <i>Fabaceae - Faboidae</i></p> <p>Localidad <i>Stgo de Cuba</i></p> <p>Prov. <i>Stgo de Cuba</i> Coord. _____</p> <p>Leg. <i>Lidieska Meriño Reyes</i></p> <p>Fecha <i>1-3-2016</i> Hábito _____</p> <p>Formación vegetal _____</p> <p>Sustrato _____</p> <p>Fenología _____</p> <p align="right">Det. <i>Lidieska Meriño Reyes</i></p>
<p align="center">BIOECO HERBARIO DEL CENTRO ORIENTAL DE ECOSISTEMAS Y BIODIVERSIDAD (BSC)</p> <p><i>Muestra 1</i></p> <p>No. _____</p> <p>Nombre científico <i>Cyperus rotundus L.</i></p> <p>Nombre vulgar <i>"lebolote" "loquito"</i></p> <p>Familia <i>Cyperaceae</i></p> <p>Localidad <i>Stgo de Cuba</i></p> <p>Prov. <i>Stgo de Cuba</i> Coord. _____</p> <p>Leg. <i>Lidieska Meriño Reyes</i></p> <p>Fecha <i>1-3-2016</i> Hábito _____</p> <p>Formación vegetal _____</p> <p>Sustrato _____</p> <p>Fenología _____</p> <p align="right">Det. <i>Lidieska Meriño Reyes</i></p>	<p align="center">BIOECO HERBARIO DEL CENTRO ORIENTAL DE ECOSISTEMAS Y BIODIVERSIDAD (BSC)</p> <p>No. _____</p> <p>Nombre científico <i>Cynodon dactylon (L.) Pers</i></p> <p>Nombre vulgar <i>"hierba forra"</i></p> <p>Familia <i>Poaceae</i></p> <p>Localidad <i>Stgo de Cuba</i></p> <p>Prov. <i>Stgo de Cuba</i> Coord. _____</p> <p>Leg. <i>Lidieska Meriño Reyes</i></p> <p>Fecha _____ Hábito _____</p> <p>Formación vegetal _____</p> <p>Sustrato _____</p> <p>Fenología _____</p> <p align="right">Det. <i>Lidieska Meriño Reyes</i></p>

Anexo III.1. Dictamen de clasificación taxonómica de las especies de plantas estudiadas.



Anexo III.2a Ruta metabólica del ácido 2,4-diclorofenoxiacético. (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Pathway Map según Eva Young. http://umbbd.ethz.ch/2,4-d/2,4-d_map.html)

Bacterias rizoféricas promotoras del crecimiento vegetal con capacidad de degradar compuestos clorofenólicos.



Anexo III.2b. Ruta metabólica de degradación del 2,4-D formando como intermediario 2,4 diclorofenol. (2,4-D Graphical Pathway Map (1), Eva Young http://umbbd.ethz.ch/2,4-d/2,4-d_image_map1.html)