

Artículo original

Plantas herbáceas de ambientes contaminados como fuentes de bacterias degradadoras y promotoras del crecimiento vegetal

M.Cs. Irasema Pérez-Portuondo^{1*}

M.Cs. Lidieska Meriño-Reyes²

Dra.C. Rosa M. Pérez-Silva¹

Dra.C. Arelis Abalos-Rodríguez¹

Dra.C. Nele Weyens³

Dra.C. Ann Cuypers³

¹Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente. Avenida Patricio Lumumba S/N, CP 90500. Santiago de Cuba. Cuba

²Empresa Geocuba, Santiago de Cuba

³Centro de Estudios Ambientales, Universidad de Hasselt, Diepenbeek, Bélgica

*Autor para correspondencia. irasema@uo.edu.cu

RESUMEN

La búsqueda de nuevas estirpes de bacterias con capacidad de estimular el crecimiento vegetal o para ser utilizadas en tareas de biorremediación es importante ante la necesidad de desarrollar producciones agrícolas sostenibles. La rizosfera de las plantas cultivadas en ambientes contaminados con compuestos orgánicos puede ser una fuente potencial de compuestos que las bacterias degradan y con características de promotores del crecimiento de las plantas. Este trabajo tuvo como objetivo aislar bacterias con características de promotores del crecimiento vegetal de la rizosfera de plantas cultivadas en suelos contaminados con petróleo y compuestos fenólicos. También se evaluó la capacidad de crecer usando ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-diclorofenol y 4-clorofenol como única fuente de carbono. Se aislaron 51 bacterias de la rizosfera de las gramíneas *Cyperus rotundus*, *Cynodon dactylon* y *Scleria sp.* De los aislados obtenidos, 92 % creció en presencia de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, y 45 % para 2,4-diclorofenol y 4-clorofenol. El 49 % de los aislados

mostró dos o más características de promotoras del crecimiento vegetal, de ellos 16 % creció, además, en presencia de los compuestos fenólicos. Estos aislamientos se seleccionaron para evaluar la degradación de 2,4-diclorofenol y mostraron entre 15 y 40 % de degradación. En conclusión, son los primeros informes de rizobacterias aisladas de estas malezas con capacidad para degradar compuestos fenólicos. Los resultados sugieren el potencial de estas herbáceas para aislar bacterias con la capacidad de promover el crecimiento de las plantas y degradar los clorofenoles y la posibilidad de que se asocien con las plantas para la fitorremediación.

Palabras clave: rizobacterias, biodegradación, clorofenoles, *Cynodon dactylon*, *Cyperus rotundus*

Recibido: 26/03/2018

Aceptado: 19/03/2019

INTRODUCCIÓN

Las plantas indeseables, entre las que se consideran muchas especies herbáceas, aportan múltiples beneficios pues, entre otros, desempeñan servicios vitales para los ecosistemas como la protección y restauración de suelos expuestos o degradados ⁽¹⁾. A pesar de todas las ventajas que estas ofrecen para los seres humanos y la agricultura, la mayor atención sigue dirigida hacia sus impactos negativos. En la agricultura, son motivo de preocupación porque compiten con los cultivos por factores de crecimiento como agua, luz, nutrientes, espacio y quizás bajo ciertas condiciones, dióxido de carbono (esencial para la fotosíntesis). La injerencia de estas plantas afecta los rendimientos agrícolas y aumentan los costos de las operaciones agrotécnicas y del procesamiento de las cosechas ⁽²⁾.

Por esta razón, las prácticas agrícolas están directamente relacionadas con el uso de herbicidas y otros plaguicidas con el objetivo de controlar las plagas que atacan a los cultivos y de esta forma aumentar la productividad de alimentos. Sin embargo, la contaminación ambiental originada por estos plaguicidas constituye un problema de gran importancia a escala global, debido a los diferentes niveles de persistencia de estos compuestos en el ambiente, así como a la toxicidad ejercida sobre los animales domésticos, aves, peces, insectos y otros representantes de la vida salvaje ⁽³⁾.

Entre los herbicidas más empleados se encuentran los fenoxiherbicidas, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) o el ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético (MCPA). La degradación de estos compuestos conduce a la formación de fenoles (fenol, 2-clorofenol y 2,4-diclorofenol) y catecoles (catecol y 4,6-diclorocatecol). La biotransformación del ácido 4-clorofenoxiacético conduce a la formación de 4-clorofenol y la fotodegradación del Declorprop (ácido 2,4 diclorofenoxi-2-propiónico) y del 2,4-D originan la formación de 2-clorofenol, 4-clorofenol y 2,4-diclorofenol. Estos compuestos son considerados peligrosos por las regulaciones de las agencias de protección ambiental ⁽⁴⁾.

Por otra parte, la agricultura también demanda la utilización de fertilizantes, así como de estimulantes del crecimiento, para incrementar las producciones agrícolas ante condiciones, cada día más acentuadas, de baja fertilidad de los suelos y factores de estrés abiótico. Entre los últimos destacan la sequía, la salinidad y la contaminación del aire y suelo debido a presencia de metales pesados y plaguicidas, los que actúan como principales factores limitantes en la producción de los cultivos, debido a que afectan todas las funciones de las plantas.

El uso de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal para reducir el uso de compuestos químicos en la agricultura adquiere cada vez mayor relevancia en el contexto internacional como vía para garantizar la calidad ambiental y de los alimentos. En la actualidad se llevan a cabo múltiples esfuerzos para la explotación comercial de estas bacterias como bioinoculantes para varios cultivos de importancia económica ^(5,6).

Al mismo tiempo, el uso de microorganismos para eliminar xenobióticos y compuestos orgánicos persistentes es considerado un proceso amigable con el ecosistema. La actividad microbiana en la vecindad de las raíces (rizosfera) ofrece un ambiente favorable para el cometabolismo de los compuestos químicos recalcitrantes, muchos de los cuales, debido a su naturaleza, no pueden ser tomados directamente por las plantas. Se ha informado por varios investigadores, que las bacterias que habitan en la rizosfera de las plantas que crecen en terrenos contaminados tienen más probabilidades de degradar compuestos tóxicos, constituyendo una fuente potencial de bacterias tolerantes a los compuestos presentes en dicho ambiente y con capacidad para metabolizarlos ^(7,8).

La rizosfera de muchas plantas de cultivo ha sido estudiada con el objetivo de obtener bacterias que sean promotoras de crecimiento vegetal y degradadoras de compuestos

xenobióticos ⁽⁹⁾; sin embargo, las plantas herbáceas indeseables han sido largamente ignoradas ⁽¹⁰⁾. Cada vez son más las investigaciones donde se exploran las plantas herbáceas como fuentes de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, debido a la amplia biodiversidad que ellas pueden mostrar ⁽⁶⁾. Si a ello se une que muchas de sus especies son capaces de crecer en ambientes contaminados ⁽¹¹⁻¹³⁾, entonces estas también podrían ser aprovechadas para el aislamiento de bacterias que reúnan ambas capacidades.

Este trabajo se planteó como objetivo aislar bacterias rizosféricas de plantas herbáceas crecidas en sitios contaminados con compuestos fenólicos, capaces de exhibir características promotoras del crecimiento vegetal y de utilizar compuestos fenólicos como única fuente de carbono.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de rizobacterias a partir de plantas que viven en suelos contaminados

Se colectaron ejemplares de tres especies vegetales que crecen en el área de Movimiento y Almacenaje de Productos (MAP) en la Refinería Hermanos Díaz, de la Provincia Santiago de Cuba. Esta es un área de 56 m², contaminada con hidrocarburos y compuestos fenólicos caracterizada por la presencia de un suelo arenoso (76,7 % de arena, 6,9 % de grava y 16,4 % de arcilla), con pH 7,2 y 24,7 % de capacidad de campo, cuya composición en fosfato y nitrato es de $5,60 \times 10^{-2}$ y 3,82 mg g⁻¹ de suelo, respectivamente ⁽¹⁴⁾. Se tomaron muestras de las plantas herbáceas *Cyperus rotundus* L, *Scleria* sp. y *Cynodon dactylon* (L).

Las plantas se extrajeron, preservando la tierra que las rodeaba y cuidando tomar toda la raíz, sin que esta sufriera afectación y depositadas en bolsas plásticas para su traslado.

Las rizobacterias se aislaron de acuerdo a la metodología descrita por Woyessa y Assefa ⁽¹⁵⁾. Para ello se removió cuidadosamente el suelo de las raíces y entonces estas fueron lavadas con agua destilada estéril para remover tantas bacterias como fuera posible. Se mezclaron por agitación 10 g del suelo de rizosfera de cada planta con 90 mL del agua de lavado de las raíces de la propia planta. Se realizaron diluciones seriadas de las suspensiones obtenidas de cada planta, utilizando MgSO₄·7 H₂O 0,01 mol L⁻¹. Posteriormente, 0,1 mL de cada suspensión, así como de las correspondientes diluciones, fue sembrado por diseminación en placas con agar nutriente. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. Se seleccionaron

colonias representativas de todos los tipos morfológicos, las cuales fueron subcultivadas en medio agar nutriente para su purificación. Los aislados obtenidos se purificaron mediante resiembras sucesivas en placas con agar nutriente y se conservaron en cuñas de este mismo medio a 4 °C.

Evaluación de la presencia de características de promotoras de crecimiento vegetal en las bacterias aisladas

La evaluación se realizó atendiendo a la presencia o no de las siguientes características:

- Producción de ácidos orgánicos, acetoína y ácido indolacético
- Fijación de nitrógeno atmosférico
- Solubilización del fosfato de calcio

La producción de ácidos orgánicos se evaluó por el método colorimétrico de Cunningham y Kuiack ⁽¹⁶⁾, adicionando el indicador alizarina roja al 0,1 % a cultivos bacterianos crecidos durante 5 días en medio sacarosa-triptona (ST). El cambio de color de rosado a amarillo indicó respuesta positiva.

La producción de acetoína se detectó inoculando las bacterias en medio Voges-Proskauer. Luego de 48 h de incubación se indujo una respuesta colorimétrica acorde a Romick y Fleming ⁽¹⁷⁾, tomando como respuesta positiva la aparición de una coloración rosa-rojiza.

El ensayo para detectar las bacterias que solubilizan el fosfato fue desarrollado acorde a Nautiyal ⁽¹⁸⁾. La presencia de un halo claro alrededor de las colonias indica capacidad solubilizadora de fosfato.

Para evaluar la capacidad de producir ácido indolacético (AIA) se utilizó el ensayo de Salkowsky (adaptado de Patten y Glick) ⁽¹⁹⁾. Las bacterias se inocularon en 1 mL de medio 869 1/10 suplementado con 0,5 g L⁻¹ de triptófano. Después de incubar durante 4 días se indujo una reacción colorimétrica adicionando el reactivo de Salkowsky (Gordon y Weber) ⁽²⁰⁾. Se tomó como positividad la aparición de un color rosa.

La capacidad de fijar el nitrógeno se evaluó por el método descrito por Xie y col ⁽²¹⁾. Las bacterias aisladas se cultivaron en el medio-N suplementado con bromotimol azul (con y sin NH₄Cl como fuente de nitrógeno) e incubado durante dos semanas a 30 °C. El cambio de color de azul a amarillo se tomó como respuesta positiva a la prueba.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Crecimiento en medio mineral con clorofenol como única fuente de carbono

Se utilizaron los siguientes compuestos clorofenólicos grado analítico: 4-clorofenol (Merck), 2,4-diclorofenol (SIGMA-ALDRICH), Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (SIGMA-ALDRICH).

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 $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , pH 7,2), $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, suplementado con 10 mL de una solución de elementos traza compuesta de (en mgL^{-1}): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 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 L^{-1} . Al medio se adicionó agar ($1,5 \text{ g L}^{-1}$), el indicador bromotimol azul ($0,04 \text{ g L}^{-1}$), así como el herbicida clorofenólico 2,4-D ($0,2 \text{ g L}^{-1}$). Los aislados que fueron capaces de crecer y producir cambios de coloración en la colonia o en el medio de azul a amarillo fueron declarados como positivos al ensayo de degradación ⁽²²⁾.

Los aislados que resultaron positivos al ensayo se sembraron entonces en placas conteniendo el mismo medio de cultivo, pero sustituyendo el 2,4-D por 4-clorofenol o 2,4-diclorofenol como únicas fuentes de carbono, ambos a una concentración de $0,02 \text{ g L}^{-1}$. Las placas se incubaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 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 ambos clorofenoles se consideraron con capacidad de degradar los compuestos fenólicos ensayados ⁽⁹⁾ y se seleccionaron para los estudios posteriores.

Ensayos de evaluación de la capacidad degradadora del 2,4-diclorofenol de los aislados de rizosfera seleccionados

Preparación de los inóculos bacterianos

Los aislados bacterianos seleccionados se inocularon en 10 mL de caldo nutriente. Se incubaron durante 72 h a 33 °C en agitación. La biomasa se separó por centrifugación y se lavó dos veces con $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 mol L⁻¹.

Biodegradación de 2,4-diclorofenol

La biodegradación fue desarrollada en agua destilada utilizando 5 % de biomasa húmeda, 0,2 g L⁻¹ del clorofenol y un volumen de reacción de 2 mL. La reacción se desarrolló en agitación a 30 °C, durante 24 h. Se llevó en paralelo un ensayo control sin biomasa⁽²³⁾. Al sobrenadante se realizaron los análisis de fenoles y cloruro. La cuantificación de los clorofenoles se realizó mediante el método colorimétrico de la 4-aminoantipirina, según la modificación de Farrell y Quilty⁽²⁴⁾ del procedimiento descrito en el Standard Methods for the Determination of Water and Wastewater⁽²⁵⁾, en tanto la concentración de cloruro se analizó colorimétricamente según Jörg y Bertau⁽²⁶⁾. El porcentaje de degradación de los clorofenoles fue determinado acorde a la ecuación 1.

$$\% \text{ Degradación} = \left(\frac{C_i - C_f}{C_i} \right) * 100$$

Donde C_i fue la concentración inicial del compuesto y C_f la concentración final. El cloruro se cuantificó por la ecuación de la recta de la curva patrón de cloruro de sodio (0,003-0,1 g L⁻¹).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos experimentales fue realizado usando el programa Statgraphics Centurion XV. Se realizó un análisis de clasificación simple (ANOVA I) y la prueba de rangos múltiples basada en el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para la comparación de medias. En todos los casos se utilizó 5 % de

significación. Estas pruebas se utilizaron para comparar la degradación del clorofenol y la liberación de cloruro entre los aislados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La colecta de las plantas se realizó en un área localizada en la refinería de petróleo caracterizada por la contaminación del suelo con crudo y compuestos fenólicos, derivados del proceso de refinación.

En el terreno se observó abundancia de plantas herbáceas y algunos ejemplares arbustivos. Las herbáceas recolectadas pertenecieron a la Familia Cyperaceae: *Cyperus rotundus* L y *Scleria sp* y a la Familia Poaceae: *Cynodon dactylon* (L), todas de la Clase Monocotyledonea. *C. dactylon* (bermuda grass o grama común) y *C. rotundus* (corocillo o coquito) son dos herbáceas que están consideradas como plagas invasoras de muchos cultivos, con efectos alelopáticos debido a la liberación al suelo de múltiples compuestos aleloquímicos que afectan el desarrollo de las plantas vecinas ^(27,28).

Estas plantas han sido referenciadas por algunos autores como especies que crecen en suelos contaminados con hidrocarburos y que pueden degradar el petróleo y el diésel ^(29,30). Sarathambal e Ilamurugu las utilizaron como fuente de rizobacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato ⁽⁵⁾.

Otros autores ^(31,32) describieron a *C. dactylon* como útil para la rehabilitación de suelos explotados por la minería y suelos contaminados con metales pesados.

El procedimiento de rizobacterias seguido permitió el aislamiento de 51 bacterias, encontrándose el mayor número de aislados en las plantas herbáceas *C. rotundus* y *Scleria sp*. (Tabla 1)

Tabla 1. Distribución de rizobacterias según la fuente de aislamiento

Plantas	Cantidad de bacterias aisladas
<i>C. rotundus</i>	20
<i>Scleria sp</i>	17
<i>C. dactylon</i>	14
Total	51

Características de promotoras de crecimiento vegetal de las rizobacterias aisladas.

En la Tabla 2 se muestra un resumen de las rizobacterias aisladas de cada planta que presentaron más de una característica de promotora del crecimiento vegetal. Como puede observarse, la aparición de estas características estuvo marcadamente influenciada por el origen de las bacterias, o sea, por la planta de la cual procedían. Este hallazgo sugiere que la especie vegetal influye en la colonización diferencial de la rizosfera por determinados grupos bacterianos, aun cuando estas especies vegetales crezcan en el mismo entorno.

Tabla 2. Características de promotoras del crecimiento vegetal en las rizobacterias aisladas de plantas crecidas en suelos contaminados con hidrocarburos

	Aislados	Producción Acetoína	Producción de ácidos orgánicos	Solubilización de fosfato	Fijación de nitrógeno	Producción de AIA
<i>Cyperus rotundus</i>	RR-42	-	+	+	-	+
	RR-45	-	+	+	-	-
	RR-47	+	-	+	-	-
	RR-48	-	+	+	-	-
	RR-50	-	+	+	-	-
	RR-51	-	+	+	-	-
	RR-52	-	+	+	-	-
	RR-53	-	+	+	-	-
	RR-54	-	+	+	-	-
	RR-56	-	+	+	-	+
RR-102	-	+	+	-	+	
<i>Scleria sp</i>	RR-62	-	+	+	-	-
	RR-63	-	+	+	-	-
	RR-64	-	+	+	-	-
	RR-69	-	+	+	-	-
	RR-72	-	+	+	-	+
	RR-75	-	+	+	-	-
<i>Cynodon dactylon</i>	RR-76	-	+	+	-	-

RR-79	-	+	+	-	+
RR-81	-	+	+	+	+
RR-84	-	+	+	+	+
RR-85	-	+	+	-	+
RR-86	+	+	-	-	-
RR-87	+	+	-	-	-
RR-88	+	+	-	-	-

Al comparar, para cada especie de planta, los porcentajes de aislados que presentaron características de promotoras del crecimiento, se encontró que *C. rotundus* aportó 5 % de aislados capaces de producir acetoina y ácido indolacético, 65 % con capacidad de producir ácidos orgánicos y 60 % de solubilizadores de fosfatos. En *Scleria sp.* se observó 71 % de aislados productores de ácidos orgánicos y 53 % de solubilizadores de fosfato, así como 6 % de productores de ácido indolacético; no se aislaron fijadores de nitrógeno ni productores de acetoina. Se observó que 36 % de los aislados obtenidos de *C. dactylon* solubilizaron fosfatos; sin embargo, el 100 % produjo ácidos orgánicos, en tanto cuatro aislados produjeron ácido indolacético y dos fueron capaces de fijar nitrógeno atmosférico, siendo así mismo la planta que más aportó aislados productores de acetoina (21 %).

Otros autores plantearon que las interacciones entre las plantas y los microorganismos del suelo son altamente dinámicas en la naturaleza y están basadas en presiones co-evolutivas, por lo que no es asombroso encontrar que la comunidad microbiana en la rizosfera difiera entre especies vegetales, entre genotipos dentro de las especies, e incluso entre diferentes etapas del desarrollo de las plantas ⁽³³⁾.

Se encontró que la capacidad de fijar nitrógeno y producir acetoina fueron las menos frecuentes, en tanto la característica predominante fue la de producir ácidos orgánicos, al obtenerse entre tres y cuatro aislados con las primeras características y 39 bacterias productoras de ácidos orgánicos.

Varios autores han planteado que los ácidos orgánicos producidos por las bacterias solubilizadoras de fosfato no son determinantes en la solubilización y que el único factor determinante es la concentración de iones hidronio (H_3O^+), los que se producen en la

respiración o como consecuencia de la asimilación de iones amonio (NH_4^+), lo cual altera el pH del medio, lo suficiente como para movilizar minerales del suelo ^(34,35).

En este trabajo se evaluaron las capacidades de producir ácidos orgánicos y solubilizar el fósforo inorgánico insoluble, encontrándose que ambas características eran independientes en algunas de las bacterias aisladas, lo cual sugiere la existencia de varios mecanismos de solubilización. Nahas apoyó que existían varios mecanismos, los cuales incluían no solo la excreción de ácidos orgánicos, sino además la extrusión de protones o la producción de agentes quelantes ⁽³⁶⁾. Otros mecanismos, como la producción de ácidos inorgánicos tales como ácido sulfúrico, ácido nítrico o ácido carbónico han sido mencionados por otros autores ⁽³⁷⁾.

La literatura revisada recoge datos del aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal de rizosfera de plantas valiosas para la economía, como son algodón, trigo, maíz ⁽³⁸⁾ y arroz ⁽³⁹⁾. A pesar de ello, cada vez son más los trabajos donde se exploran otras plantas herbáceas como fuente de rizobacterias con características de promotoras, debido a la amplia diversidad bacteriana que pueden mostrar ^(5,10). Esta investigación se convierte en otro aporte a la utilización de estas plantas como fuentes de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Los nuevos aislados, portadores de estas valiosas cualidades, pudieran ser empleados en suelos deficientes de nutrimentos para mitigar el estrés y lograr la sostenibilidad de los cultivos ⁽⁵⁾.

Las plantas indeseables pueden ser dañinas para los cultivos, debido a que muchas de ellas producen sustancias tóxicas que inhiben el desarrollo de los cultivos (alelopatía) o compiten con estos por luz, espacio y nutrientes. Por otro lado, cuando crecen donde no afecten los cultivos o durante la rotación de estos, se pueden aprovechar muchas de las propiedades beneficiosas que ellas ofrecen como son protección del suelo de la erosión, restauración de la biodiversidad, absorción, conservación y reciclaje de nutrientes solubles, que de otra manera se filtrarían por el suelo, así como la restauración de los suelos expuestos o degradados ⁽¹⁾. Algunas plantas herbáceas toleran compuestos y elementos tóxicos e incluso los degradan o acumulan en su interior, lo cual constituye otro aspecto de gran valor a favor de estas plantas, aspecto corroborado al aislar plantas de ambientes contaminados con hidrocarburos y compuestos fenólicos.

Debido a la utilización de compuestos químicos como plaguicidas muchas veces queda una concentración residual o se producen intermediarios más tóxicos durante su degradación, por lo que se genera una contaminación en los terrenos donde estos compuestos son utilizados. Algunos plaguicidas contienen metales pesados en su estructura (hexacloruro de cobre), los cuales tienden a acumularse en el suelo o en las plantas. Esta contaminación puede diseminarse hacia las aguas superficiales y las subterráneas, trasladando la contaminación hacia otros ecosistemas más sensibles o son atrapados en las partículas del suelo dificultando su eliminación. Estos contaminantes pueden permanecer en los ecosistemas aún cuando se haya abandonado su uso, pudiendo acumularse en los organismos vivos y concentrar su efecto tóxico en la cadena alimenticia causando daños no solo a las especies blanco sino además a otras especies beneficiosas como abejas, peces, microorganismos del suelo, así como al hombre ⁽⁴⁰⁾.

Todo lo antes expuesto avala las perspectivas enormes que ofrecen estas plantas para posibles estrategias de biorremediación de suelos agrícolas, contribuyendo no solo como reservorio de bacterias estimuladoras del crecimiento vegetal, sino también por sus propias implicaciones en procesos de remoción de contaminantes.

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

Para determinar la habilidad de las bacterias rizosféricas aisladas de crecer en diferentes compuestos clorofenólicos y seleccionar las de mejor comportamiento ante todos los compuestos ensayados, se realizó un ensayo de crecimiento utilizando ácido 2,4-D como única fuente de carbono y energía (Tabla 3). De los 51 aislados ensayados, 92 % mostró capacidad de crecer en 2,4-D, sugiriendo que pueden degradar este compuesto para utilizarlo como fuente de carbono para la biosíntesis del material celular.

Tabla 3. Crecimiento en clorofenoles de las rizobacterias aisladas

	2,4-D (0,2g L ⁻¹)	2,4-DCF (0,02g L ⁻¹)	4-CF (0,02g L ⁻¹)	2,4-DCF y 4-CF (0,02g L ⁻¹)
<i>C. rotundus</i>	17 (85)	8 (40)	5 (25)	3 (15)
<i>Scleria sp</i>	16 (94)	14 (82)	12 (71)	11 (65)
<i>C. dactylon</i>	14 (100)	10 (71)	10 (71)	9 (64)
Total	47 (92)	32 (63)	27 (53)	23 (45)

Entre paréntesis se encuentran los porcentos respecto al total en cada planta

Muchos compuestos fenólicos son exudados por las raíces de las plantas. Los microorganismos capaces de usar estos compuestos fenólicos como fuente de carbono, frecuentemente tienen las enzimas que pueden co-metabolizar contaminantes con similar estructura ⁽⁴¹⁾. Muchos de estos compuestos como naringina, miricetina, catequina y otros, son liberados por las raíces de las plantas y se ha mostrado que estimulan el crecimiento de bacterias degradadoras de bifenilos policlorados (PCB). Algunos autores han mostrado que el exudado de terpenos (ej. 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 ⁽⁴²⁾.

La literatura plantea que existen dos rutas por la cual puede degradarse el 2,4-D. La primera ruta involucra a la alfa-cetoglutarato dioxigenasa para dar lugar al 2,4-diclorofenol, mientras que la otra ruta comienza activando una dehalogenasa para formar el 4-clorofenoxiacetato, el cual se transforma en 4-clorofenol ⁽⁴³⁾. Este conocimiento indica la necesidad de explorar si las bacterias que sean capaces de crecer en 2,4-D son capaces a su vez de utilizar alguno o ambos de los dos intermediarios principales de estas rutas: el 2,4-diclorofenol y el 4-clorofenol.

El hallazgo de bacterias que pueden crecer en ambos compuestos sugiere que esas bacterias pueden degradar cualquiera de ellos sin que resulte inhibitorio para su crecimiento (Tabla 3). Este resultado significa que estas bacterias pueden ser empleadas para remediar suelos que pudieran estar contaminados incluso con ambos compuestos.

El número y clase de bacterias que se encuentran en diferentes suelos puede estar influenciado 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 en ellos crece.

Los resultados evidenciaron que *Scleria sp* y *C. dactylon* fueron las que más aportaron en aislados de rizosferas con capacidad de utilizar los clorofenoles. Lo encontrado coincide con lo planteado por otros autores ⁽⁴⁴⁾, al ofrecer 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.

Acorde a los resultados obtenidos se escogieron aquellas bacterias que eran capaces de crecer en los clorofenoles ensayados y, además, presentaban varias características que promovieran el crecimiento vegetal, siendo seleccionados ocho aislados.

Bacterias capaces de reunir ambas características buscadas (crecimiento en presencia de plaguicidas y propiedades de promotoras de crecimiento vegetal) han sido descritas por varios autores (35,45), siendo los compuestos más mencionados el 2,4-D, pentaclorofenol, triclorofenol y 4-clorofenol, pero no se han encontrado hasta el momento referencias sobre la degradación de 2,4-diclorofenol por rizobacterias. No obstante, Ahemad y Saghir referenciaron la tolerancia de rizobacterias aisladas por ellos a fungicidas y herbicidas en cuya estructura química estaban el 4-clorofenol y 2,4-diclorofenol ⁽⁹⁾.

Degradación de compuestos clorofenólicos por las rizobacterias seleccionadas

Al evaluar la degradación del 2,4-DCF ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), el principal intermediario de la degradación del herbicida 2,4-D, por rizobacterias seleccionadas se corroboró la capacidad degradadora sugerida al crecer en este compuesto como única fuente de carbono (Tabla 4). Los resultados obtenidos mostraron que el aislado RR72 es el que presentó las mejores características. La aparición de cloruro libre confirmó la degradación del clorofenol.

Tabla 4. Examen de los aislados para la degradación del 2,4-diclorofenol

Aislados	Biodegradación (%)
RR56	22 <i>a</i>
RR62	22 <i>a</i>
RR72	40 <i>b</i>
RR79	18 <i>c</i>
RR81	22 <i>a</i>
RR84	15 <i>d</i>
RR88	19 <i>c</i>
RR102	6 <i>e</i>

Para $p < 0,05$, letras diferentes evidencian diferencias significativas

Otros autores encontraron una degradación de 15 % a las 24 h y entre 70-85 % a los 7 días cuando ensayaron este compuesto a igual concentración ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) ⁽⁴⁶⁾, atribuyendo a la toxicidad del compuesto y de la dosis empleada el comportamiento de la bacteria pues

referenciaron hasta 98 % de degradación para concentraciones menores de 0,1 g L⁻¹. Los resultados mostraron que el procedimiento empleado fue capaz de evaluar de una manera rápida la capacidad de degradar de los microorganismos de interés, lo que permite su empleo como método de cribado dirigido a la selección de bacterias con alta capacidad de degradación de clorofenoles.

Hasta la fecha, no existen reportes de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de especies de *Scleria*, por lo que los resultados obtenidos serían la primera comunicación sobre este hallazgo. De igual modo, no se tienen antecedentes de rizobacterias aisladas de *Scleria*, *C. rotundus* y *C. dactylon* que crezcan utilizando 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4-D como únicas fuentes de carbono.

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 51 aislados de la rizosfera de tres plantas herbáceas crecidas en suelos contaminados con compuestos fenólicos e hidrocarburos, lo que evidencia la utilidad práctica de estas plantas como fuente de bacterias con características promisorias para usos de biorremediación de suelos.
- La herbácea *C. dactylon* aportó la mayor cantidad de aislados productores de acetoína y de ácidos orgánicos, así como bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, características deseadas para formular los biofertilizantes.
- El 92 % de los aislados bacterianos creció en presencia del herbicida 2,4-D como única fuente de carbono lo cual sugiere su capacidad para degradarlo.
- Las herbáceas *Scleria sp.* y *C. dactylon* aportaron la mayor proporción de aislados rizosféricos capaces de utilizar los clorofenoles intermediarios de la degradación del 2,4-D (2,4-DCF y 4-CF) como única fuente de carbono.
- De las ocho bacterias seleccionadas siete mostraron capacidad de degradar el 2,4-DCF, principal intermediario de la degradación del 2,4-D y materia prima para su obtención.

RECOMEDACIONES

- A partir de los resultados alcanzados en este trabajo, se recomienda evaluar la capacidad de los aislados obtenidos como estimuladores del crecimiento vegetal. Estos aislados también podrán ser empleados para mitigar el estrés causado a los cultivos por la deficiencia de nutrientes, así como en la sustitución de fertilizantes químicos.
- Evaluar las capacidades de estos aislados para la descontaminación de suelos tratados con el herbicida 2,4-D u otros plaguicidas de base fenólica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento aportado por el proyecto P1 “Servicios Científicos Medioambientales para el desarrollo de una agricultura sostenible y enfrentamiento al cambio climático en el oriente de Cuba”, dentro del proyecto VLIR-IUC establecido entre las Universidades flamencas de Bélgica con la Universidad de Oriente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schonbeck M. An ecological understanding of weeds. *Revista Extensión*. 2013;20:1–7.
2. Qasem JR, Foy CL. Weed allelopathy, its ecological impacts and future prospects: a review. *Journal of Crop Production*. 2001;4(2):43–119. doi:10.1300/J144v04n02_02
3. Verma JP, Jaiswal DK, Sagar R. Pesticide relevance and their microbial degradation: a state-of-art. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2014;13(4):429–66. doi:10.1007/s11157-014-9341-7
4. Kotresha M. Degradation of phenol by novel strain *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4997 isolated from petrochemical industrial effluent. *International Journal of Microbial Resource Technology*. 2014;2(3):7–15.
5. Sarathambal C, Ilamurugu K. Phosphate solubilising diazotrophic bacteria associated with rhizosphere of weedy grasses. *Indian Journal of Weed Science*. 2014;46(4):364–9.
6. Ashok K, Bihari RM, Richa R. Characterization of bacterial strains and their impact on plant growth promotion and yield of wheat and microbial populations of soil. *African Journal of Agricultural Research*. 2015;10(12):1367–75. doi:10.5897/AJAR2014.8894
7. Balseiro-Romero M, Gkorezis P, Kidd PS, Vangronsveld J, Monterroso C. Enhanced degradation of diesel in the rhizosphere of after inoculation with diesel-degrading and plant

- growth-promoting bacterial strains. *Journal of Environment Quality*. 2016;45(3):924. doi:10.2134/jeq2015.09.0465
8. Kala DS. Rhizoremediation: a promising rhizosphere technology. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*. 2014;8(8):23–7. doi:10.5772/56905
9. Ahemad M, Khan MS. Assessment of pesticide-tolerance and functional diversity of bacterial strains isolated from rhizospheres of different crops. *Insight Microbiology*. 2011;1(1):8–19. doi:10.5567/IMICRO-IK.2011.8.19
10. Sarathambal C, Ilamurugu K, Priya LS, Barman KK. A review on weeds as source of novel plant growth promoting microbes for crop improvement. *Journal of Applied and Natural Science*. 2014;6(2):880–6.
11. Khoramnejadian S, Khoramnejadian S. Phytoremediation of heavy metals and total petroleum hydrocarbons by amaranth. *Journal of Biology and Today's World*. 2013;2(12):514–6.
12. Tsuboi S, Yamamura S, Nakajima-Kambe T, Iwasaki K. Diversity of alkane hydroxylase genes on the rhizoplane of grasses planted in petroleum-contaminated soils. *Springer Plus*. 2015;4(1):514–6. doi:10.1186/s40064-015-1312-0
13. Mishra T, Pandey VC, Singh P, Singh NB, Singh N. Assessment of phytoremediation potential of native grass species growing on red mud deposits. *Journal of Geochemical Exploration*. 2017;182:206–9. doi:10.1016/j.gexplo.2016.12.015
14. Nápoles J, Rodríguez S, Santiago L, Ábalos A. Disminución del extracto orgánico total en suelos contaminados con hidrocarburos. *Tecnología Química*. 2015;35(3):322–33.
15. Woyessa D, Assefa F. Diversity and plant growth promoting properties of rhizobacteria isolated from tef (*Eragrostis tef*). *Ethiopian Journal of Education and Sciences*. 2011;6(2):81–94.
16. Cunningham JE, Kuiack C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992;58(5):1451–8.
17. Romick TL, Fleming HP. Acetoin production as an indicator of growth and metabolic inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*. 1998;84(1):18–24.

18. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 1999;170(1):265–70. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x
19. Patten CL, Glick BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68(8):3795–801.
20. Gordon SA, Weber RP. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*. 1951;26(1):192–5.
21. Xie GH, 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(1):56–63. doi:10.1002/jobm.200510513
22. Kröckel L, Focht DD. Construction of chlorobenzene-utilizing recombinants by progenitive manifestation of a rare event. *Applied and Environmental Microbiology*. 1987;53(10):2470–5.
23. Bhaskar G, Rita V, Rita V, Rita V. Biodegradation of chlorobenzene and chlorophenols by *Pseudomonas* cultures. *Research Journal of Chemistry and Environment*. 2013;17(7):40–3.
24. Farrell A, Quilty B. Degradation of mono-chlorophenols by a mixed microbial community via a meta- cleavage pathway. *Biodegradation*. 1999;10(5):353–62. doi:10.1023/A:1008323811433
25. Rice EW, Baird RB, Eaton AD. Standard methods for the examination of water and wastewater [Internet]. 23rd Edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; 2017 [cited 2019 Apr 8]. 1350 p. Available from: <https://store.awwa.org/store/productdetail.aspx?productId=65266295>
26. Jörg G, Bertau M. Thiol-tolerant assay for quantitative colorimetric determination of chloride released from whole-cell biodehalogenations. *Analytical Biochemistry*. 2004;328(1):22–8. doi:10.1016/j.ab.2004.01.027
27. Geethambigai, CS, Prabhakaran J. Allelopathic influence of *Cyperus rotundus* L. and *Cynodan dactylon* L. on physico-chemical and biological properties of soil. *International Journal of Current Biotechnology*. 2014;2(11):5–8.
28. Ameena M, Geethakumari VL, Sansamma G. Allelopathic influence of purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) root exudates on germination and growth of important field crops. *International Journal of Agricultural Sciences*. 2014;10(1):186–9.

29. Basumatary B, Saikia R, Bordoloi S. Phytoremediation of crude oil contaminated soil using nut grass, *Cyperus rotundus*. *Journal of Environmental Biology*. 2012;33(5):891–6.
30. Subhashini V, Swamy AVVS. Phytoremediation of cadmium and chromium contaminated soils by *Cyperus rotundus*. *American International Journal of Research in Science, Technology, Engineering & Mathematics*. 2014;6(1):97–101.
31. Singh K, Pandey VC, Singh RP. *Cynodon dactylon*: An efficient perennial grass to revegetate sodic lands. *Ecological Engineering*. 2013;54:32–8. doi:10.1016/j.ecoleng.2013.01.007
32. Srinivasan D, Ilavenil KK. Bioremediation of dyes and heavy metal ions using *Cynodon dactylon* – A Review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. 2017;10(1):363–70.
33. Keshav PS, Shivesh S, Kumar S, Vasudha S, Kirti T, Sphoorti S. Nature and role of root exudates: Efficacy in bioremediation. *African Journal of Biotechnology*. 2013;10(48):9717–24. doi:10.5897/AJB10.2552
34. Souza R de, Ambrosini A, Passaglia LMP. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*. 2015;38(4):401–19. doi:10.1590/S1415-475738420150053
35. Rajasankar R, Manju Gayathry G, Sathiavelu A, Ramalingam C, Saravanan VS. Pesticide tolerant and phosphorus solubilizing *Pseudomonas* sp. strain SGRAJ09 isolated from pesticides treated *Achillea clavennae* rhizosphere soil. *Ecotoxicology*. 2013;22(4):707–17. doi:10.1007/s10646-013-1062-0
36. Nahas E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 1996;12(6):567–72. doi:10.1007/BF00327716
37. Seshadri S, Muthukumarasamy R, Lakshminarasimha C, Ignacimuthu S. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. *Current Science*. 79(5).
38. Mohite B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 2013;13(3):638–49. doi:10.4067/S0718-95162013005000051
39. Tan KZ, Radziah O, Halimi MS, Khairuddin AR, Habib SH, Shamsuddin ZH. Isolation and characterization of rhizobia and plant growth-promoting rhizobacteria and their effects

on growth of rice seedlings. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 2014;9(3):342–60. doi:10.3844/ajabssp.2014.342.360

40. Chaudhry Q, Schröder P, Werck-Reichhart D, Grajek W, 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. doi:10.1007/BF02987313

41. Musilova L, Ridl J, Polivkova M, Macek T, Uhlik O. Effects of secondary plant metabolites on microbial populations: changes in community structure and metabolic activity in contaminated environments. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(8):1205. doi:10.3390/ijms17081205

42. Oh ET, Koh SC, Kim E, Ahn YH, So JS. Plant terpenes enhance survivability of polychlorinated biphenyl (PCB) degrading *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 labeled with gfp in microcosms contaminated with PCB. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2003;13(3):463–8.

43. Arora P, Bae H. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microbial Cell Factories*. 2014;13(1):31. doi:10.1186/1475-2859-13-31

44. Huang X-F, Chaparro JM, Reardon KF, Zhang R, Shen Q, Vivanco JM. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*. 2014;92(4):267–75. doi:10.1139/cjb-2013-0225

45. Shaheen S, Sundari K. Exploring the applicability of pgpr to remediate residual organophosphate and carbamate pesticides used in agriculture fields. *International Journal of Agriculture and Food Science Technology*. 2013;4(10):947–54.

46. Patel BP, Kumar A. Optimization study for maximizing 2,4-dichlorophenol degradation by strain using response surface methodology and kinetic study. *Desalination and Water Treatment*. 2015;57(39):18314–25. doi:10.1080/19443994.2015.1091988

Grass from contaminated environments as sources of degrader bacteria and plant growth promoters

M.Cs. Irasema Pérez-Portuondo^{1*}

M.Cs. Lidieska Meriño-Reyes²

Dra.C. Rosa M. Pérez-Silva¹

Dra.C. Arelis Abalos-Rodríguez³

Dra.C. Nele Weyens⁴

Dra.C. Ann Cuypers⁴

¹Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente. Avenida Patricio Lumumba S/N, CP 90500. Santiago de Cuba. Cuba. Teléfono: 53 22 632095

²Empresa Geocuba, Santiago de Cuba.

³Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente.

Dirección postal: Avenida Patricio Lumumba S/N, CP 90500. Santiago de Cuba. Cuba.

⁴Centro de Estudios Ambientales, Universidad de Hasselt, Diepenbeek, Bélgica.

* Author for correspondence. irasema@uo.edu.cu

ABSTRACT

The search for new strains of bacteria capable of stimulating plant growth or that in bioremediation tasks is essential to the need of developing sustainable agricultural production is used. Plants rhizosphere grown in environments contaminated with organic compounds may be a potential source of compounds bacteria degrade and with characteristics of plant growth promoters. This work aimed to isolate bacteria with characteristics of plant growth promoters from the rhizosphere of plants grown on contaminated soils with petroleum and phenolic compounds. Also the ability to grow using 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-dichlorophenol and 4-chlorophenol as the sole carbon source was evaluated. Fifty-one

bacteria from rhizosphere grasses of *Cyperus rotundus*, *Cynodon dactylon* and *Scleria sp* were isolated. At presence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid it grew 92 %, and in 2,4-dichlorophenol and 4-chlorophenol 45 % grew. The 49 % of the isolates showed two or more characteristics of plant growth promoters of which 16 % also grew in phenolic compounds. These isolates were selected to evaluate degradation of 2,4-dichlorophenol and showed between 15 – 40 % degradation. In conclusion, it is the first reports of rhizobacteria isolated from these weeds with capacity to degrade phenolic compounds. Results suggest the potential of these grasses to isolate bacteria with ability to promote plant grow as well as to degrade chlorophenols and the possibility of their associating to plants for phytoremediation.

Key words: rhizobacteria, biodegradation, chlorophenols, *Cynodon dactylon*, *Cyperus rotundus*

INTRODUCTION

Undesirable plants, among which many herbaceous species are considered, provide multiple benefits because, among others, they perform vital services for ecosystems such as the protection and restoration of exposed or degraded soils ⁽¹⁾. Despite all the advantages, they offer for humans and agriculture, the greatest attention remains directed towards their negative impacts. In agriculture, they are a cause for concern because they compete with crops for growth factors such as water, light, nutrients, space and perhaps under certain conditions, carbon dioxide (essential for photosynthesis). The interference of these plants affects agricultural yields and increases the costs of agrotechnical operations and crop processing ⁽²⁾.

For this reason, agricultural practices are directly related to the use of herbicides and other pesticides, in order to control pests that attack crops and thus increase food productivity. However, the environmental pollution caused by these pesticides constitutes a problem of great importance on a global scale, due to the different levels of persistence of these compounds in the environment, as well as the toxicity exerted on domestic animals, birds, fish, insects and other representatives of wildlife ⁽³⁾.

Among the herbicides more used are phenoxy-herbicides such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) or e l 4-chloro-2-methylphenoxyacetic (MCPA). The degradation of these compounds leads to the formation of phenols (phenol, 2-chlorophenol and 2,4-dichlorophenol) and catechols (catechol and 4,6-dichlorocatechol). The biotransformation of

4-chlorophenoxyacetic acid leads to the formation of 4-chlorophenol and photodegradation of Dieldrin (2,4-dichlorophenoxy-2-propionic acid) and 2,4-D cause the formation of 2-chlorophenol, 4-chlorophenol and 2,4-dichlorophenol. These compounds are dangerous by the regulations of environmental protection agencies ⁽⁴⁾.

On the other hand, agriculture also demands the use of fertilizers, as well as growth stimulants, to increase agricultural production under conditions, every day more accentuated, with low soil fertility and abiotic stressors. Among the latter, drought, salinity, and air and soil pollution stand out due to the presence of heavy metals and pesticides, which act as the main limiting factors in crop production, because they affect all plant functions.

The use of plant growth promoting bacteria to reduce the use of chemical compounds in agriculture is becoming increasingly important in the international context as a way to guarantee environmental and food quality. Currently, multiple efforts are being made for the commercial exploitation of these bacteria as bioinoculants for various crops of economic importance ^(5,6).

At the same time, the use of microorganisms to eliminate xenobiotics and persistent organic compounds is an ecosystem friendly process. Microbial activity near the roots (rhizosphere) offers a favorable environment for the cometabolism of recalcitrant chemical compounds, many of which, due to their nature, cannot be taken directly by plants. Several researchers has reported that bacteria that live in the rhizosphere of plants that grow in contaminated land are more likely to degrade toxic compounds, constituting a potential source of bacteria tolerant to the compounds present in that environment and with the ability to metabolize them ^(7,8).

With the aim of obtaining bacteria that are promoters of plant growth and degraders of xenobiotic compounds, the rhizosphere of many crop plants has been studied ⁽⁹⁾; however, undesirable herbaceous plants have long been ignored ⁽¹⁰⁾. Increasingly the investigations where the plants are scanned herbaceous as sources of plant growth promoting rhizobacteria, due to the wide biodiversity that can display them ⁽⁶⁾. Many of its species are capable of growing in contaminated environments if it is added ⁽¹¹⁻¹³⁾, then these could also be used for the isolation of bacteria that meet both capacities.

This work has as objective isolating rhizospheric bacteria from herbaceous plants grown in sites contaminated with phenolic compounds, capable of exhibiting characteristics promoting plant growth and using phenolic compounds as the sole source of carbon.

MATERIALS AND METHODS

Insulation of rizobacteria from plants living in contaminated soils

Specimens were collected three plant species growing in the area of movement and storage of products (MAP) in Refinery “Hermanos Díaz”, Santiago de Cuba province. This is an area of 56 m², contaminated with hydrocarbons and phenolic compounds characterized by the presence of a sandy soil (76.7 % sand, 6.9 % gravel and 16.4 % clay), with pH 7, 2 and 24.7 % field capacity, whose composition in phosphate and nitrate is 5.60 x 10⁻² and 3.82 mg g⁻¹ of soil, respectively (14). Samples of the herbaceous plants as *Cyperus rotundus* L, *Scleria sp.* and *Cynodon dactylon* (L), were taken.

In the work, plants were preserved with the land around them and taking all the roots carefully, without this involvement and deposited in plastic bags for transport.

Rhizobacteria are isolated rum according to the methodology described by Woyessa and Assefa⁽¹⁵⁾. For this, soil was removed carefully from the roots and then these were washed with sterile distilled water to remove as many bacteria as possible. 10 g of the rhizosphere soil of each plant was mixed by stirring with 90 mL of the washing water from the roots of the plant itself. Serial dilutions were made from each suspension obtained from each plant, using MgSO₄ 7H₂O 0.01 mol L⁻¹. Subsequently, 0,1 mL of each suspension, as well as the corresponding dilutions, was seeded by spread plating with nutrient agar. Plates at 37 °C for 48 h were incubated. Representative colonies were selected of all morphological types, which were subcultured on nutrient agar medium for purification. The isolates obtained are purified by successive replantings on nutrient agar plates and was preserved in wedges of the same medium at 4 °C.

Evaluation of the promoter characteristic presence of vegetable growth in the isolated bacteria

The evaluation was carried out based on the presence or absence of the following characteristics:

- Production of organic acids acetoin and indoleacetic acid
- Fixation of atmospheric nitrogen
- Solubilization of calcium phosphate

The production of organic acids was evaluated by the colorimetric method of Cunningham and Kuiack ⁽¹⁶⁾, adding the indicator to 0.1 % red lizarin to bacterial cultures grown for 5 days in sucrose-tryptone (ST) medium. Changing color, from pink to yellow that indicated response positive.

Acetoin production was detected by inoculating the bacteria in Voges-Proskauer medium. After 48 hours of incubation a colorimetric response was induced according to Romick and Fleming ⁽¹⁷⁾, taking as a positive response the appearance of a reddish-pink color.

The test to detect the bacteria that solubilize the phosphate was developed according to Nautiyal ⁽¹⁸⁾. The presence of a clear halo around the colonies indicates phosphate-solubilizing capacity.

The Salkowsky test (adapted from Patten and Glick) ⁽¹⁹⁾ was used to evaluate the ability to produce indoleacetic acid (AIA). The bacteria were inoculated in 1 mL of 869 1/10 medium supplemented with 0.5 g L⁻¹ of tryptophan. After incubating for 4 days a colorimetric reaction was induced by adding the Salkowsky reagent (Gordon and Weber) ⁽²⁰⁾. The appearance of a pink color was taken as positivity.

The ability to fix nitrogen was evaluated by the method described by Xie *et al* ⁽²¹⁾. The isolated bacteria were grown in the N-medium supplemented with blue bromothymol (with and without NH₄ Cl as a nitrogen source) and incubated for two weeks at 30 ° C. El color change from blue to yellow was taken as a response positive to the test .

All trials were performed in triplicate.

Growth in the mining environment with chlorophenol as the only carbon source

The following analytical grade chlorophenolic compounds were used: 4-chlorophenol (Merck), 2,4-dichlorophenol (SIGMA-ALDRICH), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (SIGMA-ALDRICH).

To select bacterial isolates capable of growing in the presence of chlorophenols as the only carbon source, a chlorine-free mineral medium (MMS) was used. It consists in 0.02 mol L^{-1} phosphate buffer (KH_2O_4 , Na_2HPO_4 , pH 7.2), 0.5 g L^{-1} of $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ and 0.2 g L^{-1} of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in distilled water, supplemented with 10 mL of a solution of elements trace complete up of (in mg L^{-1}): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 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 and acidified with 1 mL of concentrated sulfuric acid L^{-1} .

To medium was added agar (1.5 g L^{-1}), bromothymol blue indicator (0.04 g L^{-1}), and the herbicide chlorophenoxy 2,4-D (0.2 g L^{-1}). The isolates that were able to grow and produce color changes in the colony or in the medium from blue to yellow were declared positive to the degradation test⁽²²⁾.

The isolates that were positive to assay seem to then on plates containing the same medium, but substituting 2,4-D by 4-chlorophenol or 2,4-dichlorophenol as unique carbon source, both at a concentration 0.02 g L^{-1} . The plates were incubated at 30°C for 5 days to assess growth. Media plates that were not inoculated were used as controls. The tests were performed in duplicate.

Bacteria that were able to grow in the presence of both chlorophenols were considered capable of degrading the phenolic compounds tested⁽⁹⁾ and were selected for subsequent studies.

Evaluation tests of the degrading capacity of selected rizosphere 2,4-dichlorophenol isolated

Preparation of inoculum bacterial

The selected bacterial isolates were inoculated in 10 mL of nutrient broth. They were incubated for 72 h at 33°C with stirring. The biomass was separated by the centrifugation and it was washed twice with $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 mol L^{-1} .

Biodegradation of 2,4-dichlorophenol

Biodegradation was carried out in distilled water using 5 % wet biomass, 0.2 g L^{-1} of chlorophenol and a reaction volume of 2 mL. The reaction was run under stirring at 30°C , for 24 h. Is LLEV or parallel control assay without biomass⁽²³⁾. To the supernatant, the analyzes of phenols and chloride were performed. The quantification of chlorophenol is

performed by means of the colorimetric method of 4-aminoantipyrine, according to modifying Farrell and Quilty⁽²⁴⁾ the procedure described in Standard Methods for the Determination of Water and Wastewater⁽²⁵⁾, while the chloride concentration was analyzed colorimetrically according to Jörg and Bertau⁽²⁶⁾. The degradation percentage of chlorophenols was determined according to equation 1.

$$\% \text{ Degradation} = \left(\frac{C_i - C_f}{C_i} \right) * 100$$

Where C_i was the initial concentration of the compound and C_f the final concentration. The chloride was quantified by the equation of the straight line of the sodium chloride standard curve (0.003- 0.1 g L⁻¹).

Statistical analysis

Statistical analysis of experimental data was performed using the STATGRAPHICS Centurion XV program. Simple classification analysis (ANOVA I) and multiple range test was performed based on the significant difference procedure minimum (LSD) of Fisher for comparison of means. In all cases, 5 % significance was used. These tests were used to compare the degradation of chlorophenol and release of chloride between isolates.

RESULTS AND DISCUSSION

The collection of plants was performed in a localized area in the gasoil refinery characterized by soil contamination with oil and phenolic compounds derived from the refining process.

In the field a lot of herbaceous plants and some bushy specimens were observed. The herbaceous collected belonged to Cyperaceae family: *Cyperus rotundus* L and *Scleria* sp and to the Poaceae Family: *Cynodon dactylon* (L), all from Monocotyledonea class.

C. dactylon (bermuda grass or common grass) and *C. rotundus* (corocillo or coquito) are two herbaceous that are considered as invasive pests of many crops, with allelopathic effects due to the release to the soil of multiple allelochemical compounds that affect the development of the neighboring plants^(27,28).

These plants have been referenced by some authors as species that grow in soils contaminated with hydrocarbons and that can degrade oil and diesel ^(29,30) . Sarathambal and Llamurugu used them as a source of nitrogen fixing rhizobacteria and phosphate solubilizers ⁽⁵⁾.

Other authors ^(31,32) described *C. dactylon* as useful for the rehabilitation of soils exploited by mining and soils contaminated with heavy metals.

The followed procedure of rizobacteria allowed the isolation of 51 bacteria, being the highest number of herbaceous plants isolated in *C. rotundus* and *Scleria sp.* (Table 1).

Table 1. Distribution of rhizobacteria according to the source of isolation

Plants	Amount of bacteria isolated
<i>C. rotundus</i>	20
<i>Scleria sp</i>	17
<i>C. dactylon</i>	14
Total	51

Characteristics of promoters of vegetable growth of isolated rhizobacteria

Table 2 shows a summary of rhizobacteria isolated from each plant had more than one property of promoting plant growth is shown. As it can observed, the appearance of these characteristics was markedly influenced the origin of bacteria, that is, the plant from which they came. This finding suggests that the plant species influences the differential colonization of the rhizosphere by certain bacterial groups, even when these plant species grow in the same environment.

Table 2. Characteristics of plant growth promoters in rhizobacteria isolated from plants grown in soils contaminated with hydrocarbons

Isolated	Acetoin Production	Organic acid production	Phosphate Solubilization	Fixation of nitrogen	Production of A I A
<i>Cyperus rotundus</i>	RR-42	-	+	+	+
	RR-45	-	+	+	-
	RR-47	+	-	+	-
	RR48	-	+	+	-
	RR-50	-	+	+	-

	RR-51	-	+	+	-	-
	RR-52	-	+	+	-	-
	RR-53	-	+	+	-	-
	RR-54	-	+	+	-	-
	RR-56	-	+	+	-	+
	RR-102	-	+	+	-	+
<i>Scleria sp</i>	RR-62	-	+	+	-	-
	RR-63	-	+	+	-	-
	RR-64	-	+	+	-	-
	RR-69	-	+	+	-	-
	RR-72	-	+	+	-	+
	RR-75	-	+	+	-	-
<i>Cynodon dactylon</i>	RR-76	-	+	+	-	-
	RR-79	-	+	+	-	+
	RR-81	-	+	+	+	+
	RR-84	-	+	+	+	+
	RR-85	-	+	+	-	+
	RR-86	+	+	-	-	-
	RR-87	+	+	-	-	-
	RR-88	+	+	-	-	-

To compare, for each plant species, the percentage of isolates that showed characteristics of growth promoters, it was found that *C. rotundus* contributed 5 % of isolates capable of producing acetoin and indoleacetic acid, 65 % with ability to produce organic acids and 60 % phosphate solubilizers. In *Scleria sp.* 71 % of isolates producing organic acids and 53 % of phosphate solubilizers were observed, as well as 6 % of producers of indolacetic acid; no nitrogen fixers or acetoin producers were isolated. It was observed that 36 % of isolates obtained from *C. dactylon* solubilized phosphates ; however , the 100 % produced organic acids, while four isolates produced indoleacetic acid and two were able of fixing atmospheric nitrogen, thus being same 1 to plant more producers provided isolated acetoin (21 %).

Other authors hypothesized that the interactions between plants and soil microorganisms are highly dynamic in nature and are based on co-evolutionary pressures, so it is not surprising to find that the microbial community in the rhizosphere differs between species including genotypes within species, and even between different stages of plant development ⁽³³⁾.

It was found that the ability to fix nitrogen and produce acetoin were the least frequent, while the predominant characteristic was to produce organic acids, obtaining between three and four isolates with the first characteristics and 39 bacteria producing organic acids.

Several authors have argued that organic acids produced by phosphate solubilizing bacteria are not determinants in solubilization. The only determining factor is the concentration of hydronium ions (H_3O^+), those that occur in respiration or as a consequence of assimilation of ammonium ions (NH_4^+), which alters the pH of medium, enough as to mobilize minerals in the soil ^(34,35).

In this work, the capacities of producing organic acids and solubilizing the insoluble inorganic phosphorus were evaluated finding that both characteristics were independent in some of the isolated bacteria, which suggests the existence of several solubilization mechanisms.

Nahas supported that there were several mechanisms, which included not only the excretion of organic acids, but also the extrusion of protons or the production of chelating agents ⁽³⁶⁾. Other mechanisms such as, the production of inorganic acids such as sulfuric acid, nitric acid or carbonic acid have been mentioned by other authors ⁽³⁷⁾.

The literature reviewed collects data on the isolation of bacteria that promote plant growth of rhizosphere of plants that are valuable for the economy, such as cotton, wheat, corn ⁽³⁸⁾ and rice ⁽³⁹⁾. Despite this, more and more works are being explored where other herbaceous plants are explored as a source of rhizobacteria with promoter characteristics, due to the wide bacterial diversity they can show ^(5,10). This research becomes another contribution to the use of these plants as sources of plant growth promoting rhizobacteria. These new isolates, carriers of these valuable qualities, could be used soils with deficient nutrients to mitigate stress and achieve sustainability of crops ⁽⁵⁾.

The plants undesirable can be harmful for crops, because many of them produce toxic substances that inhibit crop growth (allelopathy) or compete with these by light, space and nutrients. On the other hand, when they grow where they do not affect crops or during rotation of these it can take advantage of many of the beneficial properties they offer. These are

protection of soil erosion, restoration of biodiversity, absorption, preservation and recycling of soluble nutrients, which would be filtered otherwise through the soil, as well as the restoration of exposed or degraded soils ⁽¹⁾. Some plants herbaceous tolerated compounds and toxic elements even degrade or build-up and an inside, which is another aspect of great value for these plants, aspect corroborated by isolating plants contaminated with hydrocarbons and phenolic environments.

Due to the use of chemicals such as pesticides often, it remains a residual concentration or is more toxic intermediates produced during degradation, so that contamination is generated on the sites where these compounds are used. Some pesticides with heavy metals in their structure (copper hexachloride), which tend to accumulate in the soil or in plants. This contamination may spread to surface waters and groundwater, transferring contamination to other more sensitive ecosystems or are trapped in the particles of soil it difficult to remove. These pollutants can remain in ecosystems even when their use has been abandoned, being able to accumulate in living organisms and concentrate their toxic effect on the food chain causing damage not only to white species but also to other beneficial species such as bees, fish, microorganisms from the ground, as well as man ⁽⁴⁰⁾.

All of the foregoing supports the enormous perspectives offered by these plants for possible bioremediation strategies of agricultural soils, contributing not only as a reservoir of plant growth stimulating bacteria, but also for their own implications in contaminant removal processes.

Capacity of the rizobacteria of growing in mineral environment with chlorophenols as the only carbon source

To determine the ability of the bacteria rhizosphere isolates grow in different chlorophenoxy compounds and selecting the best behavior in all compounds tested, one was performed growth assay using 2,4-D acid as the sole source of carbon and energy (Table 3). From 51 isolates tested 9 2 % showed capacity to grow on 2,4-D, suggesting that this compound can degrade to use as carbon source for biosynthesis cell material.

Table 3. Growth in chlorophenols of isolated rhizobacteria

	2,4-D (0.2g L ⁻¹)	2,4-DCF (0.02g L ⁻¹)	4-CF (0.02g L ⁻¹)	2,4-DCF and 4-CF (0.02g L ⁻¹)
<i>C. rotundus</i>	17 (85)	8 (40)	5 (25)	3 (15)
<i>Scleria sp</i>	16 (94)	14 (82)	12 (71)	11 (65)
<i>C. dactylon</i>	14 (100)	10 (71)	10 (71)	9 (64)
Total	47 (92)	32 (63)	27 (53)	23 (45)

In brackets are the percentages with respect to the total in each plant

Plant roots exude many phenolic compounds. Microorganisms capable of using these phenolic compounds as a carbon source often have enzymes that can co-metabolize contaminants with similar structure ⁽⁴¹⁾. Many of these compounds, such as naringin, myricetin, catechin and others are released by plant roots and have been shown to stimulate the growth of polychlorinated biphenyls (PCB) degrading bacteria. Some authors have shown that terpene exudate (eg α -pinene, α -terpinen, among others) can act on the activity of the enzyme biphenyl dioxygenase in PCB degrading bacteria, activating or inhibiting it ⁽⁴²⁾.

The literature suggests that there are two routes by which 2,4-D can be degraded. The first route involves the alpha-ketoglutarate dioxygenase to give rise to 2,4-dichlorophenol, while the other route begins by activating a dehalogenase to form 4-chlorophenoxyacetate, which transforms into 4-chlorophenol ⁽⁴³⁾. This knowledge indicates the need to explore whether bacteria that are capable of growing in 2,4-D are capable of using either or both of the two main intermediates of these routes: 2,4-dichlorophenol and 4- chlorophenol

The discovery of bacteria that can grow in both compounds suggests that these bacteria can degrade any of them without being inhibitory for growth (Table 3). This result means that these bacteria can be used to remedy soils that could be contaminated even with both compounds.

The number and type of bacteria found in different soil may be influenced by Asian or by its conditions, including temperature, humidity and the presence of inorganic and organic compounds (salts) as well as by the number and type of plant in they grow.

The results showed that *Scleria sp* and *C. dactylon* were the ones that contributed the most in rhizosphere isolates with the ability to use chlorophenols. The finding coincides with that raised by other authors ⁽⁴⁴⁾, by offering evidence that plant species prepare the bacterial soil community and that their exudates select the bacteria that live in their roots from the soil community in its whole.

According to the results obtained, those bacteria that were able to grow in the tested chlorophenols were chosen and, in addition, they had several characteristics that promoted plant growth, with eight isolates being selected.

Bacteria capable of meeting both characteristics sought (growth in the presence of pesticides and properties of plant growth promoters) have been described by several authors ^(35,45), the most mentioned compounds being 2,4-D, pentachlorophenol, trichlorophenol and 4-chlorophenol, but no references have been found so far on the degradation of 2,4-dichlorophenol by rhizobacteria. However, Ahemad and Saghir referred to the tolerance of rhizobacteria isolated by them to fungicides and herbicides whose chemical structure was 4-chlorophenol and 2,4-dichlorophenol ⁽⁹⁾.

Degradation of chlorophenolic compounds by selected rhizobacteria

When evaluating the degradation of 2,4-DCF (0.2 g L^{-1}), the main intermediary of the degradation of the herbicide 2,4-D, by selected rhizobacteria, the suggested degrading capacity when growing in this compound as unique was corroborated carbon source (Table 4). The results achieved showed that the RR72 isolated is the one that presented the best features. The appearance of free chloride confirmed the degradation of chlorophenol.

Table 4. Examination of the isolates for the degradation of 2,4-dichlorophenol

Isolated	Biodegradation (%)
RR56	22 <i>a</i>
RR62	22 <i>a</i>
RR72	40 <i>b</i>
RR79	18 <i>c</i>
RR81	22 <i>a</i>
RR84	15 <i>d</i>
RR88	19 <i>c</i>
RR102	6 <i>e</i>

For $p < 0.05$, different letters show significant differences

Other authors found a degradation of 15 % at 24 h and between 70-85 % at 7 days when they tested this compound at the same concentration (0.2 g L^{-1}) ⁽⁴⁶⁾. It was attributing to the toxicity of the compound and the dose used the behavior of the bacteria because they reported up to 98 % degradation for concentrations less than 0.1 g L^{-1} . The results showed that e l

procedure used was able to assess in a rapid manner capable of degrading microorganisms of interest, allowing or using as a method of screening led to the selection of bacteria with high chlorophenol degradability.

To date, there are reports of plant growth promoting rhizobacteria isolated from species of *Scleria*, so that the results would be the first communication on this finding. Similarly, there is no background of rhizobacteria isolated *Scleria*, *C. rotundus* and *C. dactylon* grow using 4-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol and 2,4-D as the only source of carbon.

CONCLUSIONS

- 51 isolated from the rhizosphere were obtained of three herbaceous plants grown in contaminated soils phenolic compounds and hydrocarbons, which demonstrates the practical utility of these plants as a source of bacteria with characteristics promising for bioremediation applications.
- The herbaceous *C. dactylon* provided the greatest amount of isolated producers of acetoin and organic acids and bacteria fixing atmospheric nitrogen, desired to formulate the characteristics biofertilizer.
- 92 % of the isolated bacterial grew in the presence of the herbicide 2,4-D as the only carbon source which suggest their ability to degrade.
- *Herbaceous Scleria sp.* and *C. dactylon* provided the highest proportion of rhizospheric isolates capable of using the intermediate chlorophenols of the degradation of 2,4-D (2,4-DCF and 4-CF) as the only carbon source .
- Of the eight bacteria selected, seven showed the ability to degrade 2,4-DCF, the main intermediary of the degradation of 2,4-D and raw material to obtain it.

RECOMMENDATIONS

- The results achieved in this work recommend evaluating the capacity of the isolates obtained as plant growth stimulators. Also, use these isolates to mitigate crop stress caused by nutrient deficiency, as well as in the substitution of chemical fertilizers.
- To assess the capabilities of these isolates for decontamination of soils treated with the 2,4-D herbicide or other phenolic- based pesticides .

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful for the funding provided by the P1 project “Environmental Scientific Services for the development of sustainable agriculture and confronting climate change in eastern Cuba”, within the VLIR-IUC project established between the Flemish Universities of Belgium with the University of East.