



# *Pseudomonas fluorescens* de suelos agrícolas degradadora del herbicida ácido 2,4 Diclorofenoxiacético

*Pseudomonas fluorescens* from agricultural soils degradator of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid herbicide

Miriam Akintui<sup>1</sup>, Heidhy Alcántara<sup>1</sup>, Alexandra Alva<sup>1</sup>, Hirwin Castillo<sup>1</sup>, José Huayán<sup>1</sup> y Luis Llenque<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Alumnos de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. (UNT)

## RESUMEN

El 2,4-Diclorofenoxiacético es uno de los herbicidas más usados para controlar malezas de hoja ancha, el ingrediente activo, sin embargo, tiene efectos crónicos sobre la salud humana y efectos letales sobre el suelo. Se ha demostrado que existen microorganismos que tienen la capacidad de degradar estos compuestos fenólicos, a la que se le denomina biorremediación. El objetivo de la investigación es determinar la presencia de *Pseudomonas fluorescens* degradadora del herbicida 2,4 D en suelos agrícolas procedentes del sector Barraza, Trujillo, Perú. Se obtuvieron muestras de suelo y de cada una se separó 10 g para efectuar diluciones, posteriormente se sembraron en agar mínimo de sales + 2,4 D y finalmente se seleccionaron colonias con diferentes morfologías. A partir de un cultivo puro se realizó la identificación basándose en su morfología cultural y característica bioquímicas, determinando la presencia de *P. fluorescens* degradador del 2,4 D aislada de suelos del sector Barraza-Trujillo.

**Palabras clave:** 2,4 D, herbicida, *Pseudomona fluorescens*, biorremediación, Barraza, Trujillo-Perú.

## ABSTRACT

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid is one of the herbicides most used to control broadleaf weeds, the active ingredient has chronic health effects, and lethal effects on the soil because it has a residual effect. It has been shown that there are microorganisms that have the capacity to degrade these phenolic compounds, which is called bioremediation. The objective of the research is to determine the presence of *Pseudomonas fluorescens* degrading 2,4 D herbicide in agricultural soils from the Barraza sector; Trujillo - La Libertad. Soil samples collected from the Barraza, Trujillo - La Libertad sector were obtained and dilutions were made from 10 grams of soil, then seeded on minimal agar + 2,4 D salts and finally colonies with different morphologies were selected. From a pure culture the identification was made based on its cultural morphology and biochemical characteristic, determining the presence of *P. fluorescens* degradant of 2,4 D isolated from soils of the sector Barraza-Trujillo.

**Keywords:** 2,4 D, herbicides, *Pseudomona fluorescens*, bioremediation, Barraza, Trujillo-Perú.

## INTRODUCCIÓN

La agricultura moderna se basa en gran medida en el uso herbicidas para el control de malezas y su facilidad para maximizar el rendimiento de los cultivos. Debido al uso excesivo de herbicidas, existe una gran preocupación sobre su potencial riesgo ambiental. La contaminación por herbicidas puede conducir a la contaminación del suelo y del agua, reducción de la biodiversidad y la disminución de bacterias heterótrofas en el suelo (incluyendo las bacterias desnitrificantes) y hongos.<sup>1,2</sup> El 2,4-Dichlorophenoxyacetic (2,4-D) es uno de los herbicidas más utilizados en el mundo y es un análogo de una hormona de crecimiento, la auxina.<sup>3</sup> Se ha propuesto como un control selectivo, efectivo y económico de malezas de hoja ancha en cultivos agrícolas, pastos y bosques durante los últimos decenios.<sup>4</sup>

El 2,4-D es uno de los herbicidas más utilizados en tierras cultivables y su alta toxicidad en los animales y plantas han reforzado el descubrimiento de vías de su degradación, junto con genes implicados en tales vías.<sup>5,6</sup>

Se han descrito a varias cepas bacterianas que son capaces de utilizar 2,4-D como fuente de carbono y energía.<sup>7-9</sup> Los géneros degradadores más comúnmente citados son *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Delftia*, *Arthrobacter* y *Burkholderia*.<sup>10-15</sup> De ellos, *Pseudomonas* ha sido registrado como el primer género que presenta especies degradadoras del compuesto y, teniendo en cuenta su ubicuidad debido a que no es exigente respecto de los componentes útiles para su sobrevivencia, es posible que esté presente en suelos agrícolas de diversos lugares, entre ellos, los de Trujillo (Perú).

La presente investigación estuvo dirigida a determinar al o los géneros bacterianos que se encuentran degradando al herbicida 2,4 D en suelos agrícolas del sector Barraza, Trujillo (Perú).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Zona de estudio.

La zona de muestreo se ubica a 38 msnm a 8° 06' 59.23" LS y 78° 59' 07.01" LO, en el sector **Las Hectáreas** de la zona agrícola Barraza, en el distrito de Trujillo, Región La Libertad, Perú, donde se aplica frecuentemente el herbicida 2,4D con la finalidad de controlar el crecimiento de malas hierbas.

### Muestreo.

Se realizó un muestreo probabilístico en la cual se tomó 3 Kg muestra a partir de 3 hectáreas elegidas aleatoriamente de las 11 que conforman el sector, la toma de muestra se realizó entre 30 y 60 cm de profundidad, luego se transportó al laboratorio para su procesamiento, dentro de las 8 horas.

### Procesamiento de las muestras<sup>9,12</sup>

El procesamiento de la muestra se inició con la homogeneización y el tamizado de los 3 Kg de tierra. Luego se realizó el pre-enriquecimiento no selectivo, donde se pesó 700 g de muestra, luego se colocó en una bandeja de plástico de primer uso, inmediatamente se le aplicó una solución de herbicida a 360 ppm con la ayuda de un atomizador. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente (25°C) durante 7 días.

Se preparó 4 diluciones sucesivas ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$ ), partiendo del uso de 10 gramos de la muestra pre-enriquecida y 90 ml de agua destilada.

El Aislamiento selectivo se realizó sembrando por duplicado las 4 diluciones mediante la técnica de estría (0,1 mL), en un medio Agar mínimo de sales suplementado con el herbicida 2,4-D a 360 ppm, luego se incubó en estufa a 37 °C durante 8 días.

La purificación se realizó haciendo repiques en agar nutritivo, sembrado por superficie y posteriormente por estría, y además sets de coloraciones Gram para verificar la pureza, agrupación, y forma de las bacterias, para luego para conservarse como cultivo puro.

#### **Identificación de *P. fluorescens*<sup>10,20</sup>.**

La identificación se realizó en base a las características fenotípicas descritas en el manual de Berguey de bacteriología sistemática 1984. Donde se usó medios específicos para la determinación de especies de *P. fluorescens*. En Caldo glutamato se verificó la presencia de pigmentos, en la que se observó la producción de la pioverdina (verde fluorescente), característico de *P. fluorescens* y *P. putida*. Luego al caldo glutamato de le agregó cloroformo, para el descarte de la presencia de piocianina, característico de *P. aeruginosa*. En TSI se comprobó la no fermentación de azúcares (lactosa, glucosa y sacarosa); manteniéndose su color inicial (rojo). En LIA (Agar de hierro y lisina) se comprobó la ausencia enzima Lisina descarboxilasa, y por tanto se mantuvo el color original del medio (morado). En **Citrato** se verificó la degradación del citrato mediante el viraje de color verde a color azul. En SIM se verificó la movilidad (flagelo). En la **prueba de citocromo oxidasa** se verifico descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, mediante el desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno. En la **prueba de la gelatinasa** se diferenció *P. fluorescens* de *P. putida*, mediante la presencia de la enzima proteolítica (gelatinasa); donde *P. fluorescens* produce la licuefacción de la gelatina.

El proceso de biodegradación, se inició con la propagación de la bacteria conservada sembrando por estría en agar nutritivo incubando a 37°C durante 24 a 48 horas, luego se realizó la cosecha con 1 ml de caldo nutritivo, luego se obtuvo el cultivo en fase logarítmica inicial inoculando el mililitro de la cosecha en 10ml de caldo nutritivo en tubo de ensayo y se incubó 37°C durante 1 hora, luego se realizó 3 lavados con agua destilada estéril por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos, luego se realizó la resuspension de la bacteria en caldo mínimo de sales y se inoculó en un sistema semejante a aun biorreactor agitado en un recipiente de vidrio que contenía 250 ml de medio mínimo de sales suplementado con 2,4D a 360ppm, y se incubó durante 8 horas a temperatura ambiental(25°C).

Luego la determinación de la Biodegradación se realizó mediante el método de Mohr, donde se realizó la detección de iones cloruro producto de la degradación por la bacteria de la estructura química del herbicida 2,4D.

## **RESULTADOS**

Se aisló e identificó a *P. fluorecens* en suelos agrícolas del Sector Barraza de Trujillo (Perú) con capacidad de liberar iones de cloruro a partir del herbicida 2,4-Diclorofenoxiacético.

## **DISCUSIÓN**

El uso inadecuado de herbicidas ha provocado la acumulación y persistencia de agentes químicos que no solo son tóxicos en las plantas para las cuales se aplican; sino que además, por su efecto residual contaminan suelos y aguas usados en la agricultura. Uno de los herbicidas más tóxicos y aun generalmente usados es el ácido 2, 4 diclorofenoxiacético.

Debido a que algunas especies de *Pseudomonas* habitan en suelo y en la superficie de plantas, están expuestas a determinadas concentraciones de 2, 4-D, por lo que terminaron por incorporar una vía metabólica que les permita degradar este compuesto químico y utilizarlo como fuente de carbono y energía. Así como en otras investigaciones<sup>16, 11</sup>, en este estudio el medio para aislar bacterias

degradadoras de 2,4-D consistió en un medio mínimo suplementado únicamente con el herbicida para asegurar que este sea la única fuente de carbono para el aislado bacteriano.

En el presente estudio se aisló una bacteria con capacidad de degradar al 2, 4-D, *P. fluorescens*. Y aunque anteriormente ya se habían descrito otros géneros de bacterias con capacidad para degradar este compuesto como *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Delftia*, *Arthrobacter* y *Burkholderia*<sup>3,17,18,19</sup> fue en el género *Pseudomonas* donde se caracterizó por primera vez la vía de degradación del 2,4-D.<sup>20</sup>

Las enzimas que participan en la vía de degradación son codificadas por un grupo de genes que han sido encontrados generalmente en tres plásmidos el pJPI, pEMT1 y pJP<sup>18,21,22</sup> el mismo que se ha encontrado en todos los géneros antes mencionados. Por ello es que siempre existe la posibilidad de encontrar nuevas especies con la capacidad de degradar el 2,4-D, siempre y cuando estas bacterias tengan la capacidad de adquirir estos plásmidos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Juhler RK, Sørensen SR, Larsen L. Analysing transformation products of herbicide residues in environmental samples. *Water Res.* 2001; 35(6):1371–8.
2. Song J, Gu J, Zhai Y, Wu W, Wang H, Ruan Z, et al. Biodegradation of nicosulfuron by a *Talaromyces flavus* LZM1. *Bioresour Technol.* 2013;140:243-8.
3. Chaudhry GR, Huang GH. Isolation and characterization of a new plasmid from a *Flavobacterium* sp. which carries the genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *J Bacteriol.* 1988; 170(9):3897–902.
4. Garabrant DH, Philbert MA. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology. *Crit Rev Toxicol.* 2002; 32(4):233-57.
5. Holland NT, Duramad P, Rothman N, Figgs LW, Blair A, Hubbard A, et al. Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2002; 521(1-2):165–78.
6. Aksakal O, Erturk FA, Sunar S, Bozari S, Agar G. Assessment of genotoxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on maize by using RAPD analysis. *Ind Crops & Prod.* 2013; 42:552-7.
7. Baelum J, Jacobsen CS, Holben WE. Comparison of 16S rRNA gene phylogeny and functional *tfdA* gene distribution in thirty-one different 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid degraders. *Syst Appl Microbiol.* 2010; 33(2):67-70.
8. Marrón-Montiel E, Ruiz-Ordaz N, Rubio-Granados C, Juárez-Ramírez C, Galíndez-Mayer CJ. 2,4-D-degrading bacterial consortium. Isolation, kinetic characterization in batch and continuous culture and application for bioaugmenting an activated sludge microbial community. *Process Biochem.* 2006; 41(7):1521–8.
9. Sandoval-Carrasco CA, Ahuatzí-Chacón D, Galíndez-Mayer J, Ruiz-Ordaz N, Juárez-Ramírez C, Martínez-Jerónimo F. Biodegradation of a mixture of the herbicides ametryn, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in a compartmentalized biofilm reactor. *Bioresour Technol.* 2013; 145:33-6.
10. Evans WC, Smith BS, Fernley HN, Davies JI. Bacterial metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Biochem J.* 1971; 122(4):543-51.
11. Vedler E, Kõiv V, Heinaru A. TfdR, the LysR-type transcriptional activator, is responsible for the activation of the *tfdCB* operon of *Pseudomonas putida* 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradative plasmid pEST4011. *Gene.* 2000; 245(1):161–8.
12. Greer CW, Hawari J, Samson R. Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* isolated from peat. *Arch Microbiol.* 1990; 154:317–22.
13. Daugherty DD, Karel SF. Degradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by *Pseudomonas cepacia* DBO1 (pRO101) in a Dual-Substrate Chemostat. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(9):3261–7.
14. Kumar A, Trefault N, Olaniran AO. Microbial degradation of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid: Insight into the enzymes and catabolic genes involved, their regulation and biotechnological implications. *Crit Rev Microbiol.* 2016; 42(2):194-208.
15. Benndorf D, Thiersch M, Löffhagen N, Kunath C, Harms H. *Pseudomonas putida* KT2440 responds specifically to chlorophenoxy herbicides and their initial metabolites. *Proteomics.* 2006; 6(11):3319–29.
16. Chaudhry, G. R., and A. N. Ali. Bacterial metabolism of carbofuran. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 54:1414-19.

17. Don, R. H., and J. M. Pemberton. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol.* 1981; 145:681-686.
18. Fisher, P. R., J. Appleton, and J. M. Pemberton. Isolation and characterization of the pesticide-degrading plasmid pJP1 from *Alcaligenes paradoxus*. *J. Bacteriol.* 1978; 135:798-804.
19. Tiedje, J. M., J. M. Duxbury, M. Alexander, and J. E. Dawson. 2,4-D metabolism: pathway of degradation of chlorocatechols by *Athrobacter* sp. *J. Agr. Food Chem.* 1969; 17:1021-1026
20. Evans WC, Smith BSW, Fernley HN, Davies JI. Bacterial metabolism of 2,4 dichlorophenoxyacetate. *Biochem J.* 1971; 122:543 – 551
21. Bhat MA, Tsuda M, Horiike K, et al. Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60:307–12.
22. Chong NM, Chang HW. Plasmid as a measure of microbial degradation capacity for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Bioresour Technol.* 2009; 100:1174–9.