



# **“EVALUACIÓN DE LA POTENCIALIDAD DEL SISTEMA MICROORGANISMO-VEGETAL PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE SISTEMAS CONTAMINADOS”**



**TESIS DOCTORAL**

**MARÍA ZOLEICA SIMÓN SOLÁ**

**2019**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN**  
**Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L**

**“Evaluación de la potencialidad del sistema  
microorganismo-vegetal para la biorremediación  
de sistemas contaminados”**



**Licenciada María Zoleica Simón Solá**

**2019**

**Universidad Nacional de Tucumán  
Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L.**

**AUTORIDADES**

**DECANO**

Dr. Hugo Rafael Fernández

**VICE-DECANA**

Dra. Norma Lidia Nasif

**SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS**

Dra. Alejandra María Kortsarz González

**SECRETARIO DE POSGRADO**

Mag. Pablo José Sesma

**HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E I.M.L**

Dra. María Inés Isla

Dr. Eduardo Domínguez

Dra. Virginia Sara Luz Abdala

Dr. Mario Alejandro Caria

Dra. María Daniela Miotti

Dr. Julián Patricio Gómez Augier

Lic. Andrea Liliana Peralta

Sr. Osmar Antonio Lazarte

Sr. Juan Carlos Zárate

Sr. Marcos Darío Ponssa

Lic. Olga Myriam Sidán

**TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN  
DEL GRADO ACADÉMICO SUPERIOR DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**CARRERA DE DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Acreditado y Categorizado A ante la  
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)  
Resolución n°: 1007/96

Acreditado y Categorizado A ante la  
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)  
Resolución n°: 750/13

**TRABAJO DE POSGRADO TITULADO**

**“Evaluación de la potencialidad del sistema  
microorganismo-vegetal para la  
biorremediación de sistemas contaminados”**

**Tesista**

Lic. María Zoleica Simón Solá

**Directora**

Dra. Analía Alvarez

**Co-directora**

Dra. Marta Alejandra Polti

**Comisión de Supervisión de Tesis**

Dra. Mariana Rosa

Dr. Carlos Gabriel Nieto Peñalver

ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL SE REALIZÓ  
EN:

**Planta Piloto de Procesos Industriales  
Microbiológicos**

**PROIMI-CONICET**

**P R O I M I  
BIOTECNOLOGIA**



**CONICET**

Con el apoyo financiero de:

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)

Consejo de Investigaciones de la

Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT)

***Muchas gracias...***

*...a Dios por su infinita bondad y amor*

*...a mi madre por ser ejemplo de perseverancia y constancia; por sus consejos, sus valores por la motivación constante, pero más que nada, por su amor*

*...a mi padre por apoyarme siempre y por creer en mí*

*...a mi abuela y a mi hermano por su amor incondicional*

*...a las Dras. Analía Alvarez y Marta Polti por confiar siempre en mí; por su invaluable guía, dedicación y paciencia durante el desarrollo de este trabajo y, principalmente, por darme libertad en este recorrido*

*...a la Dra. María Julia Amoroso por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y guiarme en mis primeros pasos en la ciencia*

*...a la Dra. Lucía Castellanos por permitirme realizar mi Tesis Doctoral en PROIMI-CONICET*

*...a la Dra. Mariana Rosa y al Dr. Carlos Nieto por sus aportes durante el desarrollo, seguimiento y evaluación de esta Tesis Doctoral*

*...a la Dra Carolina Prado y Lic. Silvana Chocobar por aceptarme en su laboratorio y hacer de mi estancia en la Cátedra de Fisiología Vegetal una experiencia agradable.*

*...a los Dres. Juliana Saez, Claudia Benimeli, Verónica Colín, Soledad Fuentes y Sergio Cuozzo por su buena predisposición y colaboración desinteresada*

*...a mis compañeros de laboratorio con quiénes compartí este camino: Daniel, Matías, Macarena, Verena, Daiana y Enzo por enseñarme a trabajar en equipo y ayudarme siempre*

*...a mis compañeros José, Pedro, Sofía, Pablo y Florencia en quienes encontré una gran amistad, y estuvieron siempre para darme su ayuda, apoyo y cariño*



*... a la Dra. Nadia Lovaisa por sus aportes en instancias de esta Tesis Doctoral*

*... a Guillermo Borchia y Gonzalo Tapia, por su apoyo técnico y a Julia Gutierrez por su buena predisposición en el rol administrativo*

*...a todos los integrantes de PROIMI, por su colaboración y apoyo.*

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Contaminación mixta</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1 Cromo</b>	<b>6</b>
<b>1.1.1.1 Cromo trivalente</b>	<b>8</b>
<b>1.1.1.2 Cromo hexavalente</b>	<b>9</b>
<b>1.1.1.3 Biodisponibilidad de metales en suelo</b>	<b>9</b>
<b>1.1.1.4 Cromo en plantas</b>	<b>12</b>
<b>1.1.2 Plaguicidas</b>	<b>13</b>
<b>1.1.2.1 Plaguicidas organoclorados</b>	<b>13</b>
<b>1.1.2.2 Lindano</b>	<b>14</b>
<b>1.1.2.3 Biodisponibilidad de contaminantes orgánicos en suelo</b>	<b>15</b>
<b>1.1.2.4 Plaguicidas en plantas</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Biorremediación de sistemas co-contaminados</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Fitorremediación</b>	<b>17</b>
<b>1.3.1 Interacciones planta-bacteria en fitorremediación</b>	<b>19</b>
<b>1.3.1.1 Exudados radiculares</b>	<b>19</b>
<b>1.3.1.2 Efectos de las bacterias sobre el crecimiento de las plantas</b>	<b>20</b>
<b>1.3.1.3 Efectos de las bacterias sobre la biodisponibilidad de contaminantes</b>	<b>23</b>
<b>1.4 Especies vegetales en procesos de fitorremediación de suelos co-contaminados</b>	<b>24</b>
<b>1.5 Actinobacterias útiles en procesos de bio/fitorremediación</b>	<b>25</b>
<b>1.6 Bioindicadores</b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>

<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
2.1 Medios de cultivo	30
2.2 Soluciones de contaminantes	32
2.3 Colecta de muestras	32
2.4 Aislamiento de actinobacterias	33
2.4.1 A partir de muestras de suelo libres de vegetación y muestras de rizosfera	33
2.4.2 A partir de especies vegetales	34
2.5 Evaluación cualitativa de tolerancia a Cr(VI) y/o lindano	34
2.6 Preparación de inóculos microbianos	35
2.7 Identificación molecular de las cepas seleccionadas	36
2.8 Evaluación de las propiedades promotoras del crecimiento vegetal	37
2.9 Tratamiento de semillas de maíz ( <i>Zea mays</i> ) para la obtención de exudados de raíz	39
2.9.1 Esterilización superficial de las semillas	39
2.9.2 Germinación de semillas	40
2.9.3 Recolección de exudados radiculares de maíz	40
2.9.4 Caracterización parcial de los exudados radiculares de maíz	40
2.10 Bioensayos en medio líquido	41
2.10.1 Selección de cepas resistentes a Cr(VI) y lindano	41
2.10.2 Desempeño de las cepas en presencia de exudados radiculares de maíz	42
2.11 Bioensayo en suelo	42
2.11.1 Preparación del suelo y de la arena	42
2.11.2 Determinación de la capacidad de retención de agua	44
2.11.3 Determinación de la estabilidad de Cr(VI) y lindano en suelo	44
2.11.4 Evaluación de la remoción de Cr(VI) y/o lindano por la asociación planta- microorganismo	45
2.11.5 Evaluación del crecimiento vegetal	47
2.11.6 Evaluación de estrés oxidativo en las plantas	47
2.12 Determinación analítica de los contaminantes en las diferentes matrices	49

2.12.1	Determinación de metales pesados en los suelos fuente de aislamientos microbianos	49
2.12.2	Determinación de la concentración de cromo en bioensayos y muestras vegetales	50
2.12.2.1	Cuantificación de Cr(VI) en medio de cultivo líquido	50
2.12.2.2	Cuantificación de Cr(VI) biodisponible en muestras del sistema suelo-arena	50
2.12.3	Cuantificación de cromo tisular	51
2.12.4	Determinación de plaguicidas organoclorados en los suelos fuente de aislamientos microbianos y muestras del sistema suelo-arena	51
2.12.5	Extracción y determinación de lindano en medio de cultivo líquido	52
2.13	Ensayo de ecotoxicidad	52
2.14	Análisis estadístico	53

---

<b>3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>54</b>
----------	-------------------------------	-----------

3.1	Análisis de plaguicidas organoclorados y metales pesados en muestras de suelo	55
3.2	Aislamiento de actinobacterias	59
3.3	Evaluación cualitativa de la tolerancia microbiana a Cr(VI) y lindano	59
3.4	Identificación molecular de las cepas seleccionadas	60
3.5	Evaluación de propiedades promotoras del crecimiento vegetal en las cepas de <i>Streptomyces</i> sp.	62
3.6	Bioensayos en medio de cultivo líquido	65
3.6.1	Evaluación cuantitativa de la remoción de Cr(VI) y lindano por cepas de <i>Streptomyces</i> sp.	65
3.6.1.1	Determinación del crecimiento microbiano	66
3.6.1.2	Evaluación de la remoción de Cr(VI) y lindano	67
3.6.2	Desempeño de <i>Streptomyces</i> sp. Z2 y <i>Streptomyces</i> sp. Z38 en medios de cultivo contaminados en presencia de exudados radiculares de maíz	71
3.6.2.1	Composición química parcial de los exudados radiculares de plantas de maíz	71

3.6.2.2 Efecto de los exudados radiculares sobre el crecimiento microbiano	72
3.6.2.3 Efecto de los exudados radiculares de maíz en la remoción de Cr(VI) y lindano	73
3.7 Bioensayo en suelo	80
3.7.1 Determinación de la estabilidad de Cr(VI) y lindano en suelo	80
3.7.2 Evaluación de la remoción de Cr(VI) y/o lindano por el sistema planta-microorganismo	83
3.7.3 Análisis de cromo en tejidos vegetales	87
3.7.4 Evaluación del crecimiento vegetal	90
3.7.4.1 Biomasa vegetal	93
3.7.4.2 Número y longitud de hojas	94
3.7.4.3 Contenido de agua en parte aérea y raíces	98
3.8 Evaluación del estrés oxidativo en las plantas	100
3.8.1 Determinación de malondialdheido	100
3.8.2 Determinación de la actividad superóxido dismutasa	102
3.9 Evaluación de ecotoxicidad	104
<hr/>	
<b>4 CONCLUSIONES</b>	<b>108</b>
<hr/>	
<b>5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>110</b>

<b>Figura 1.1.</b> Fracciones de Cr en suelo (tomado de Aparicio, 2018)	<b>12</b>
<b>Figura 1.2.</b> Estructura química del lindano. Isómero $\gamma$ -hexaclorociclohexano ( $\gamma$ -HCH).	<b>14</b>
<b>Figura 1.3.</b> Fracción de lindano en suelo (tomada de Semple y col., 2003).	<b>16</b>
<b>Figura 2.1.</b> Ubicación de la localidad de Argentina (Santiago del Estero) (tomado de Fuentes y col., 2010).	<b>33</b>
<b>Figura 2.2.</b> Esquema para la realización del análisis cualitativo de tolerancia a Cr(VI) y/o lindano en medio mínimo sólido.	<b>35</b>
<b>Figura 3.1.</b> Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de las secuencias del ADNr 16S de cepas tolerantes a Cr(VI) y lindano.	<b>60</b>
<b>Figura 3.2.</b> Concentración de indoles producidos por las cepas de <i>Streptomyces</i> sp. cultivadas en medio líquido suplementado con distintas concentraciones de triptófano (30° C, 5 días, oscuridad). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Control negativo: medio líquido sin triptófano.	<b>63</b>

**Figura 3.3.** Biomasa microbiana de las cepas de *Streptomyces* sp. cultivadas en medio mínimo suplementado con 5 g L<sup>-1</sup> de glucosa y contaminado con 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y/o 0,25 mg L<sup>-1</sup> de lindano (30° C, 7 días, 200 rpm). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones, para cada cepa estudiada ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Control: sin contaminantes. Cr(VI); Lindano: medio contaminado. Cr(VI)/Lindano: medio co-contaminado. **67**

**Figura 3.4.** Remoción de Cr(VI) por las cepas de *Streptomyces* sp. cultivadas en medio mínimo suplementado con 5 g L<sup>-1</sup> de glucosa y contaminado con 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y/o 0,25 mg L<sup>-1</sup> de lindano (30° C, 7 días, 200 rpm). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Sin microorganismos: control abiótico. Cr(VI): medio contaminado. Cr(VI)/lindano: medio co-contaminado. **69**

**Figura 3.5.** Remoción de lindano por las cepas de *Streptomyces* sp. cultivadas en medio mínimo suplementado con 5 g L<sup>-1</sup> de glucosa y contaminado con 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y/o 0,25 mg L<sup>-1</sup> de lindano (30° C, 7 días, 200 rpm). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Sin microorganismos: control abiótico. Lindano: medio contaminado. Cr(VI)/Lindano: medio co-contaminado. **70**

**Figura 3.6.** Biomasa microbiana de las cepas de *Streptomyces* sp. Z38 y *Streptomyces* sp. Z2 cultivadas en medio mínimo suplementado con exudados radiculares (ERs) de maíz ( $0,4 \text{ g C L}^{-1}$ ) o glucosa ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) y contaminado con  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) y/o  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  de lindano ( $30^\circ \text{ C}$ , 7 días, 200 rpm). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Control: medio sin contaminantes. Cr(VI); Lindano: medio contaminado. Cr(VI)/Lindano: medio co-contaminado. 73

**Figura 3.7.** Remoción de Cr(VI) por las cepas de *Streptomyces* sp. Z38 y *Streptomyces* sp. Z2 cultivadas en medio mínimo suplementado con exudados radiculares ( $0,4 \text{ g C L}^{-1}$ ) o glucosa ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) y contaminado con  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) y/o  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  de lindano ( $30^\circ \text{ C}$ , 7 días, 200 rpm). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Controles abióticos: Sin microorganismos (no se detectó remoción). Cr(VI): medio contaminado. Cr(VI)/Lindano: medio co-contaminado. 74

**Figura 3.8.** Remoción de lindano por las cepas de *Streptomyces* sp. Z38 y *Streptomyces* sp. Z2 cultivadas en medio mínimo suplementado con exudados radiculares (ERs) de maíz ( $0,4 \text{ g C L}^{-1}$ ) o glucosa ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) y contaminado con  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) y/o  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  de lindano ( $30^\circ \text{ C}$ , 7 días, 200 rpm). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Controles abióticos: Sin microorganismos. Lindano: medio contaminado. Cr(VI)/Lindano: medio co-contaminado. 76



**Figura 3.9.** Remoción de lindano por las cepas de *Streptomyces* sp. Z38 y *Streptomyces* sp. Z2 cultivadas en medio mínimo suplementado con exudados radiculares (ERs) de maíz (0,4 g C L<sup>-1</sup>) y contaminado con 1,5 mg L<sup>-1</sup> de lindano y/o 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) (30° C, 7 días, 200 rpm). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Lindano: medio contaminado. Cr(VI)/Lindano: medio co-contaminado. **78**

**Figura 3.10.** Remoción de Cr(VI) por las cepas de *Streptomyces* sp. Z38 y *Streptomyces* sp. Z2 cultivadas en medio mínimo suplementado con exudados radiculares (ERs) de maíz (0,4 g C L<sup>-1</sup>) y contaminado con 1,5 mg L<sup>-1</sup> de lindano y/o 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Cr(VI): medio contaminado. Cr(VI)/Lindano: medio co- contaminado. **79**

**Figura 3.11.** Curva de estabilización de lindano en un sistema suelo:arena no estéril contaminado artificialmente con 2 mg kg<sup>-1</sup> de lindano (sistema contaminado) y 2 mg kg<sup>-1</sup> de lindano y 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cr(VI) (sistema co-contaminado). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). **81**

**Figura 3.12.** Curva de estabilización de Cr(VI) en un sistema suelo:arena no estéril contaminado artificialmente con 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cr(VI) (sistema contaminado) y 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cr(VI) y 2 mg kg<sup>-1</sup> de lindano (sistema co-contaminado). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). **80**

**Figura 3.13.** Concentración de lindano residual en suelos implantados con maíz inoculado con *Streptomyces* sp. Z38 luego del período de incubación (30 °C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Lin y Cr-Lin: controles abióticos. Planta-Lin; Planta-Cr-Lin; Mo-Lin; Mo- Cr-Lin; Planta-Mo-Lin; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos. **84**

**Figura 3.14.** Concentración de Cr(VI) biodisponible en suelos implantados con maíz inoculado con *Streptomyces* sp. Z38 luego del período de incubación (30 °C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Cr y Cr-Lin: controles abióticos. Planta-Cr; Planta-Lin.Cr; Mo-Cr; Mo-Cr-Lin; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo- Cr-Lin: tratamientos biológicos.. **86**

**Figura 3.15.** Contenido tisular de cromo en raíces y parte aérea de plantas de maíz inoculadas con *Streptomyces* sp. Z38 luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Planta: control biótico. Planta-Cr; Planta-Cr-Lin.; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos. **88**

**Figura 3.16.** Aspecto macroscópico de las plantas de maíz (*Zea mays*) desarrolladas en suelos sin cromo A)- en ausencia de *Streptomyces* sp. Z38 y B)- en presencia de *Streptomyces* sp. Z38 luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Lin: lindano; Mo: microorganismo. Planta; Planta-Mo: controles bióticos. Planta-Lin; Planta-Mo-Lin: tratamientos biológicos. **91**

**Figura 3.17.** Aspecto macroscópico de las plantas de maíz (*Zea mays*) desarrolladas en los sistemas contaminados con Cr(VI) A)- en ausencia de *Streptomyces* sp. Z38 y B)- en presencia de *Streptomyces* sp. Z38) luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Planta-Cr; Planta-Cr-Lin; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos. **92**

**Figura 3.18.** Biomasa de plantas de maíz inoculadas y desarrolladas en sistemas contaminados con Cr(VI) y/o lindano luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Planta y Planta-Mo: controles bióticos. Planta-Lin; Planta-Cr; Planta-Cr-Lin; Planta-Mo-Lin; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos. **94**

**Figura 3.19.** Longitud y número de hojas de plantas de maíz inoculadas y desarrolladas en sistemas contaminados con Cr(VI) y/o lindano luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Planta y Planta-Mo: controles bióticos. Planta-Lin; Planta-Cr; Planta-Cr-Lin; Planta-Mo-Lin; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos. **96**

**Figura 3.20.** Contenido de agua en la parte aérea y raíces de plantas de maíz inoculadas y desarrolladas en sistemas contaminados con Cr(VI) y/o lindano luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$  prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Planta y Planta-Mo: controles bióticos. Planta-Lin; Planta-Cr; Planta-Cr-Lin; Planta-Mo-Lin; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos. **99**

**Figura 3.21.** Contenido de malondialdehído (MDA) en las raíces de plantas de maíz inoculadas y desarrolladas en sistemas contaminados con Cr(VI) y/o lindano luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$  prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Planta y Planta-Mo: controles bióticos. Planta-Lin; Planta-Cr; Planta-Cr-Lin; Planta-Mo-Lin; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos. **101**

**Figura 3.22.** Actividad de la enzima superóxido dismutasa en las raíces de plantas de maíz inoculadas y desarrolladas en sistemas contaminados con Cr(VI) y/o lindano luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$  prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Planta y Planta-Mo: controles bióticos. Planta-Lin; Planta-Cr; Planta-Cr-Lin; Planta-Mo-Lin; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos.

**103**

**Figura 3.23.** Longitud de los hipocótilos y radículas de plántulas de lechuga desarrolladas en los suelos tratados biológicamente (25° C, 70% HR, 5 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Sin contaminantes: control biótico. Lin; Cr(VI); Cr(VI)-Lin: controles abióticos. Planta-Mo-Lin; Planta-Mo-Cr-Lin; Planta-Cr; Mo-Cr; Mo-Cr-Lin; Planta-Cr-Lin: muestras de suelo tratadas biológicamente.

**106**

<b>Tabla 2.1.</b> Medio de cultivo para el aislamiento, crecimiento y conservación de cepas.	<b>30</b>
<b>Tabla 2.2.</b> Medio de cultivo para la producción de inóculos empleados en la identificación molecular y bioensayo en suelo.	<b>30</b>
<b>Tabla 2.3.</b> Medios de cultivo para ensayos de tolerancia y de remoción de contaminantes.	<b>31</b>
<b>Tabla 2.4.</b> Medio para el cultivo de plantas de maíz.	<b>31</b>
<b>Tabla 2.5.</b> Caracterización fisicoquímica del suelo no contaminado.	<b>43</b>
<b>Tabla 2.6.</b> Diseño factorial.	<b>46</b>
<b>Tabla 3.1.</b> Plaguicidas organoclorados detectados en los suelos (fuente de muestras biológicas) y niveles guía de calidad de suelo.	<b>56</b>
<b>Tabla 3.2.</b> Metales pesados y metaloides detectados en los suelos (fuente de muestras biológicas) y niveles guía de calidad de suelo.	<b>57</b>
<b>Tabla 3.3.</b> Características promotoras del crecimiento vegetal en las cepas seleccionadas.	<b>65</b>

---

## **ABREVIATURAS**

ACC: 1-aminociclopropano-1- carboxilato

ADNr: ácido desoxirribonucleico ribosómico

AIA: ácido indolacético

AIM: ácido 3-acetamida

AIP: vía del indol 3-pirúvico

APX: ascorbato peroxidasa

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BSA: seroalbúmina bovinam

CAA: caseína almidón agar

CAS: agar- Chrome Azurol S

CAT: catalasa

Cd: cadmio

COT: carbono orgánico total

Cr: cromo

Cr(VI)<sub>B</sub>: cromo (VI) biodisponible

CRA: capacidad de retención de agua

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DDE: diclorodifenildicloroetileno

DDD: diclorodifenildicloroetano

DDT: diclorodifeniltricloroetano

DFC: 1,5-difenilcarbazida

Eq: equivalentes

ERs: exudados radiculares

GC/μECD: cromatógrafo de gases con detector de microcaptura de electrones

GR: glutatión reductasa

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno

HCH: hexaclorociclohexano

γ-HCH: isómero gamma del 1, 2, 3, 4, 5, 6 – hexaclorociclohexano (lindano)

HF: fluoruro de hidrogeno

HR: humedad relativa

IE: índice de emulsificación  
ISR: resistencia sistémica inducida  
Lin: lindano  
MDA: malondialdheido  
MM: medio mínimo  
MM<sub>1</sub>: medio mínimo suplementado con 1 g L<sup>-1</sup> de glucosa  
MM<sub>10</sub>: medio mínimo suplementado con 10 g L<sup>-1</sup> de glucosa  
MM<sub>5</sub>: medio mínimo suplementado con 5 g L<sup>-1</sup> de glucosa  
Mo: microorganismo  
N: nitrógeno  
NBT: azul de nitrotetrazolio  
O<sup>2•</sup>: radical superóxido  
OH<sup>•</sup>: radical hidroxilo  
P: fosforo  
PF: peso fresco  
pF: potencial de agua en el suelo  
PGPB: bacterias promotoras del crecimiento vegetal  
POD: peroxidasa  
POs: plaguicidas organoclorados  
ppm: parte por millón  
PS: peso seco  
Rpm: revoluciones por minuto  
SOD: superóxido dismutasa  
Tam: vía de la triptamina  
Trp: triptófano  
TSB: tripteína soja caldo  
U: unidades enzimáticas  
UFC: unidades formadoras de colonias  
*x* g: gravedad  
Fe: hierro  
mM: milimolar  
NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica



PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCP: pentaclorofenol

Ni: níquel

$p$ : probabilidad

## RESUMEN

La co-contaminación ambiental es un problema que enfrenta actualmente la población mundial debido al avance tecnológico y al crecimiento poblacional. Las técnicas de fitorremediación, basadas en las interacciones entre plantas y microorganismos se han propuesto como métodos rentables y ecológicos para limpiar sitios contaminados con tóxicos orgánicos e inorgánicos. Varios estudios demuestran la elevada disipación de contaminantes en la interfase suelo-raíz, atribuida principalmente al aumento en la densidad, diversidad y/o actividad metabólica microbiana debido a la liberación de exudados radiculares vegetales. Estas asociaciones plantas-microorganismos pueden mejorar significativamente los procesos de fitorremediación del suelo promoviendo la salud y el crecimiento vegetal, y modificando la movilidad y disponibilidad de los contaminantes. En este contexto, el objetivo de esta Tesis Doctoral fue evaluar la remoción de metales pesados y/o plaguicidas por actinobacterias y especies vegetales cultivadas en sistemas co-contaminados. Se aislaron actinobacterias desde muestras de suelo, rizósfera y especies vegetales desarrolladas en un sitio desde el que se había removido un depósito clandestino de plaguicidas. Se seleccionaron 57 colonias microbianas por presentar características compatibles con las de actinobacterias; se realizaron ensayos cualitativos de tolerancia microbiana a Cr(VI) y/o lindano, a partir de los que se seleccionaron cinco cepas en virtud de su crecimiento en presencia de ambos contaminantes. Se realizó la caracterización molecular de estos aislamientos denominados Z38, Z2, ZF, ZII y ZI, como así también el estudio de sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal y se determinó mediante secuenciamiento del ADNr 16S su filiación con cepas del género *Streptomyces*. Ensayos cuantitativos en medio líquido permitieron determinar que *Streptomyces* sp. Z38 y Z2 presentaban los mayores valores de remoción de Cr(VI) y lindano en medio de cultivo co-contaminado, por lo que se evaluó posteriormente el desempeño de ambos microorganismos en medio co-contaminado suplementado con exudados radiculares (ERs) de plantas de maíz. Comparando dicha fuente de carbono con otra como la glucosa, se encontró que la disipación de Cr(VI) en medio co-contaminado mejoraba considerablemente en presencia de ERs. En un ensayo posterior se incrementó la concentración de lindano en el medio co-contaminado y se observó que la remoción del plaguicida continuaba siendo elevada en dicho sistema, en contraposición a lo que sucedía con el cromo cuya remoción

disminuyó significativamente. Debido a que *Streptomyces* sp. Z38 presentó propiedades promotoras del crecimiento vegetal, así como también características morfológicas y fisiológicas propicias para crecer en suelo, fue seleccionada para evaluar la remoción de Cr(VI) y/o lindano en suelo artificialmente contaminado, implantado con maíz e inoculado con la bacteria. La mayor remoción de lindano se obtuvo en el sistema implantado e inoculado, mientras que la mayor remoción de Cr(VI) se obtuvo en el sistema implantado (sin microorganismo) y en el sistema inoculado (sin planta). Los resultados de estudios fisiológicos realizados en las plantas sugieren que *Streptomyces* sp. Z38 induciría un efecto protector en las mismas frente al metal. Mediante un ensayo de ecotoxicidad se demostró la disminución de Cr(VI) y lindano en los suelos tratados.

### ABSTRACT

Environmental co-contamination is a problem that currently faces the world wide population due mainly to technological progress and population growth. Phytoremediation techniques, based on the interactions between plants and microorganisms, have been proposed as cost-effective and ecological methods to clean up sites contaminated with organic and inorganic contaminants. Several studies have shown higher dissipation of contaminants at the root-soil interface, attributed mainly to the increase in density, diversity and/or microbial metabolic activity due to the release of plant root exudates. These plants-microorganisms interactions can significantly improve soil phytoremediation processes, promoting plant health and growth, and modifying the mobility and availability of contaminants. In this context, the objective of this Doctoral Thesis was to evaluate the removal of heavy metals and/or pesticides by actinobacteria and plant species grown in co-contaminated systems. Actinobacteria were isolated from soil samples, rhizosphere and plant species developed in a site from which a clandestine deposit of pesticides had been removed. Fifty-seven microbial colonies were selected because they had characteristics compatible with those of actinobacteria. Qualitative tests of microbial tolerance to Cr(VI) and/or lindane were carried out, from which five strains were selected according to their growth in the presence of both contaminants. The molecular characterization of these isolates called Z38, Z2, ZF, ZII and ZI was carried out, as well as the study of their plant growth promoting properties. By sequencing of the 16S rDNA gene, strains were identified as members of the *Streptomyces* genus.

Quantitative assays in a liquid medium allowed to determine that *Streptomyces* sp. Z38 and *Streptomyces* sp. Z2 had the highest values of Cr(VI) and lindane removal in co-contaminated culture medium, so the performance of both microorganisms in a co-contaminated medium supplemented with maize root exudates (REs) was evaluated. Comparing REs with another carbon source such as glucose, it was found that the dissipation of Cr(VI) in co-contaminated medium improved considerably in the presence of REs. In another assay, the concentration of lindane in the co-contaminated medium was increased and it was observed that lindane dissipation remained high in this system, in opposite to what happened with the chromium whose removal decreased significantly. Because *Streptomyces* sp. Z38 presented several plant growth promoting properties, as well as morphological and physiological characteristics favourable to grow in soil, it was selected to evaluate the removal of Cr(VI) and/or lindane in artificially co-contaminated soil implanted with maize and inoculated with the bacteria. The largest lindane removal was obtained in the implanted and inoculated system, while the highest Cr(VI) removal was obtained in the implanted system (without microorganism) and in the inoculated system (without plant). The results of physiological studies carried out on the plants suggest that *Streptomyces* sp. Z38 would induce a protective effect on the plant. Finally, the good quality of the treated soil was demonstrated by an ecotoxicity test.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 Contaminación mixta

En los últimos 150 años el hombre participó en una serie de avances tecnológicos tales como la revolución industrial, la primera revolución agrícola y el desarrollo de antibióticos y productos químicos terapéuticos. Estos avances trajeron beneficios innegables para los seres humanos, mejorando sus condiciones de vida, principalmente en términos de salud, transporte, medios de comunicación, vivienda y rendimientos agrícolas, permitiendo un incremento de la población mundial (Ramos y col., 2011). Sin embargo, estos avances condujeron a un serio y complejo incremento de la contaminación ambiental de suelos, sedimentos, aguas subterráneas, superficiales, el aire, la biota asociada y, por consiguiente, de los ecosistemas (Ramos y col., 2011; Romero y Cantú, 2008).

Los efectos de esta problemática se agudizan en áreas donde se encuentra presentes contaminantes orgánicos (herbicidas, taninos polifenólicos, plásticos, plaguicidas, etc.), acompañados de metales pesados y metaloides (Cd, Cu, Pb, Cr, Hg, As, etc.) en concentraciones que exceden los niveles permitidos. La presencia conjunta de estos contaminantes conduce al fenómeno conocido como co-contaminación o contaminación mixta (Chen y col., 2015). Este fenómeno es de gran relevancia ya que se estima que más de un tercio de los lugares contaminados en el mundo presentan más de un tipo de contaminante (Mansour y col., 2009; Roane y col., 2001; Tang y col., 2010, 2012).

La contaminación del suelo puede ser clasificada como difusa o localizada. La contaminación difusa es aquella en la cual el contaminante llega de forma dispersa al ambiente. Generalmente se asocia con la deposición atmosférica, prácticas agrícolas o de reciclaje inadecuadas. La contaminación puntual es aquella que procede de un punto de descarga simple e identificable. Se asocia comúnmente con la minería, industrias abandonadas o depósitos accidentales de contaminantes (Vamerali y col., 2010).

Existen muy pocos sitios contaminados reconocidos oficialmente, y en general, se encuentran en áreas industriales densamente pobladas tales como San Pablo (Brasil), Buenos Aires (Argentina) o Santiago de Chile (Chile) (Álvarez y col., 2017). En Argentina existen depósitos legales de desechos tóxicos, declarados por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Sin embargo, la realidad indica que existen depósitos ilegales no declarados a lo largo de Sudamérica, que causan contaminación.

La contaminación mixta no es ajena al NOA (Noroeste Argentino). La principal cuenca hidrográfica de esta región conocida como “Cuenca del Salí”, con un área de influencia de 60.000 hectáreas y comprendida entre los embalses de El Cadillal y Frontal de Río Hondo, recibe efluentes provenientes de diversas industrias (ingenios azucareros, destilerías, cítrícolos, etc.). Además, en áreas circundantes a esta cuenca, se llevan a cabo importantes actividades agrícolas (cultivos de soja, frutilla, arándanos y caña de azúcar, entre otros). En análisis realizados en muestras de sedimentos y aguas provenientes de la citada cuenca, se determinó la presencia de metales (Co, Cr, Cu, Cd, Mn, Ni, Zn, etc.), y plaguicidas organoclorados (lindano, metoxicloro, aldrín, dieldrín, entre otros) en concentraciones superiores a las permitidas (Benimeli, 2004; Chaile y col. 1999, 2007, 2008; Romero y col., 1997). En un pequeño pueblo llamado Argentina, en la provincia de Santiago del Estero, se detectó en el año 1994 el depósito clandestino más importante de contaminantes conocido en Sudamérica. Se trataba de una “tumba de plaguicidas” que contenía más de 30 toneladas de plaguicidas organoclorados y metales pesados [entre ellos Cr(VI)] (Barra y col., 2006; Fuentes y col., 2010). En marzo de 2004, las toneladas de tierra contaminadas fueron desenterradas, cargadas en un buque y trasladadas a Alemania para su tratamiento definitivo y disposición final. La empresa Sava, en la ciudad alemana de Brunsbuttel, se encargó de realizar el incineramiento de la tierra.

Los ambientes co-contaminados con metales pesados y compuestos orgánicos son considerados difíciles de remediar debido a la naturaleza mixta de estos contaminantes. En este contexto, uno de los principales desafíos en los últimos años es la búsqueda de soluciones al grave problema ambiental de los sitios contaminados. Esto condujo al desarrollo de tecnologías de remediación ecoamigables que no solo impliquen el tratamiento de un único compuesto, sino más bien, metodologías que permitan remover/degradar simultáneamente más de un contaminante.

### 1.1.1 Cromo

Desde el inicio de la revolución industrial, los ecosistemas se encuentran expuestos de manera creciente a una variedad de metales pesados y metaloides potencialmente peligrosos.

En particular, la acumulación de contaminantes inorgánicos no biodegradables como el cromo se vio incrementado exponencialmente en los ecosistemas (Adriano, 2001; Desaules, 2012; Herter y Kuelling, 2001).

El cromo es un elemento metálico de amplia distribución en la naturaleza y ocupa el lugar 21 dentro de los elementos más abundantes de la corteza terrestre (Gallios y Vaclavikova, 2008). Es un metal duro, quebradizo, de color gris acerado brillante. Su configuración electrónica lo hace muy resistente a la acción de los agentes atmosféricos físicos y químicos debido a la formación de una capa de óxido muy estable por lo que es muy utilizado para prevenir la corrosión (Economou-Eliopoulos y col., 2013; Sinha y col., 2005).

En la naturaleza, el cromo (Cr) se encuentra como cromita ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ) en rocas ultramáficas, o como un constituyente de la vauquelinita [ $\text{CuPb}_2(\text{CrO}_4)(\text{PO}_4)(\text{OH})$ ], tarapacaíta ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ), bentorita [ $\text{Ca}_6\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3(\text{OH})_{12}\cdot 26\text{H}_2\text{O}$ ] y crocoita ( $\text{PbCrO}_4$ ) (Avudainayagam y col., 2003; Babula y col., 2009). También se encuentra como impureza en un gran número de minerales como la esmeralda, el rubí, el granate, etc., a los que da sus colores típicos. El Cr puede permanecer en los minerales, co-precipitado con óxidos e hidróxidos de Mn, Al y/o Fe, adsorbidos en las partículas del suelo y formando complejos con los compuestos orgánicos presentes (Hsu y col., 2015).

El cromo por su ubicación en la Tabla Periódica puede presentar los estados de oxidación II, III, IV, V y VI Sin embargo, en la naturaleza solo se encuentra en los estados +3 [Cr(III)] y +6 [Cr(VI)] los cuales son estables y persistentes en ambientes acuáticos y terrestres (Zayed y Terry, 2003). Los grados de oxidación IV y V solo se forman como intermediarios inestables en las reacciones redox en las que interviene el sistema Cr(III)/Cr(VI). Ambas formas tienen características biogeoquímicas diferentes (Choppala y col., 2016). De hecho, están reguladas por separado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA, 2000) lo cual representa una característica distintiva del Cr entre los metales pesados.

El cromo es muy utilizado en actividades industriales que incluyen el curtido de cueros, metalurgia, aleación, galvanoplastia, esmaltes cerámicos, inhibición de la corrosión del agua, conservación de la madera, producción de ladrillos refractarios, tinturas, mordientes textiles, pinturas, pigmentos, pulpa y papel (Butera y col., 2015; Chen y col., 2016), lo que da lugar a que el mayor problema relacionado al Cr sea la liberación indiscriminada del metal al medio ambiente en concentraciones



significativamente elevadas. Nuestro país tiene un largo historial de contaminación por Cr, ligada principalmente a dos tipos de industrias: mineras y curtiembres, por lo cual se encuentra en elevadas concentraciones en agua, suelos, sedimentos, plantas, animales y sus derivados (Gagneten, 2002; Gagneten y Ceresoli, 2004).

### 1.1.1.1 Cromo trivalente

El Cr(III) es anfótero y es la forma más estable en que se encuentra este metal, ya que se requiere de elevada energía para convertirlo en otros estados de oxidación más bajos o más altos. Debido a su baja afinidad por iones de óxido e hidróxido, el Cr(III) forma numerosos complejos con ligandos orgánicos e inorgánicos (Deng y col., 2003), lo que convierte a este ión en una especie generalmente inmóvil en el suelo. Las principales especies de Cr(III) en solución acuosa incluyen  $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})_3$ , y  $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$ . El  $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$  predomina a  $\text{pH} < 3,6$ ; mientras que  $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$  predomina a  $\text{pH} > 11,5$ . A  $\text{pH}$  ligeramente ácidos hasta alcalinos, las especies iónicas de Cr(III) precipitan como  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  amorfo,  $\text{Cr}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , o como un complejo  $(\text{FeCr})(\text{OH})_3$  si en el medio hay Fe(III). El Cr(III) también puede ser quelado por moléculas orgánicas que son adsorbidas sobre las superficies minerales (US EPA, 2000).

El Cr(III) es un micronutriente esencial en los sistemas biológicos, el cual participa en el metabolismo de la glucosa, el colesterol y los ácidos grasos. Además, desempeña un papel muy importante en diferentes reacciones enzimáticas (Gómez García y Garns, 2004). Otras de las funciones fisiológicas del Cr(III) incluyen la estabilización de las estructuras terciarias de proteínas y la estabilización del ADN y ARN (Zayed y Terry, 2003). Sin embargo, a elevadas concentraciones el mismo podría generar daños nocivos para los sistemas biológicos. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer clasificó al Cr(III) dentro del Grupo III, que comprende a los agentes “no clasificables sobre la base de su carcinogenicidad para los humanos” (IARC, 1987). Esta clasificación se debe a la escasa toxicidad del ión, lo que le confiere baja solubilidad y por consiguiente movilidad y biodisponibilidad (Lovley, 1995).

## 1.1.1.2 Cromo hexavalente

El Cr en su estado de oxidación VI presenta una relación carga/radio atómico muy elevada, por lo que no puede formar cationes en medio acuoso. En solución, el Cr(VI) forma aniones oxigenados:  $\text{HCrO}_4^-$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$  y  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  cuya proporción depende del pH de la solución. A pH básico y neutro, predomina  $\text{CrO}_4^{2-}$ , a pH entre 6 y 6,2 aumenta la concentración de  $\text{HCrO}_4^-$ , y a pH muy bajos, predomina el ion  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ .

El Cr(VI) se caracteriza por ser altamente soluble en medio acuoso y sumamente móvil en el suelo. Además, es altamente reactivo con otros elementos. Sus compuestos son potentes oxidantes y pueden reaccionar con la materia orgánica y otros agentes reductores para formar Cr(III) (Deng y col., 2003). Estas características convierten al Cr(VI) en un agente extremadamente tóxico para los organismos vivos, aún a niveles muy bajos ( $< 1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) resultando aproximadamente 1.000 veces más tóxico y mutagénico que el Cr(III) (Amin y Kassem, 2012; Marti y col., 2013).

El Cr(VI) puede causar daños adversos en la salud generando toxicidad aguda y crónica, neurotoxicidad, dermatotoxicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad e inmunotoxicidad (Bagchi y col., 2002). En base a esta evidencia el Cr(VI) se categorizó como “carcinógeno para humanos” (Grupo 1) por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 1987). El Cr(VI) ocupa el 7° lugar de las principales sustancias peligrosas en la lista establecida por la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades.

## 1.1.1.3 Biodisponibilidad de metales en suelo

Desde hace décadas, autoridades legislativas de todo el mundo establecieron valores de referencia de metales potencialmente tóxicos en los suelos para manejar los sitios contaminados. Los valores guía para la evaluación de estos sitios fueron establecidos en base al contenido total del metal en el suelo. Sin embargo, esto puede sobrestimar inadvertidamente el riesgo potencial, causando innecesarios y costosos esfuerzos de remediación de estos suelos (Alexander, 2000; Derz y col., 2012; NRC Committee, 2003).

Numerosos estudios demostraron que un organismo se verá afectado negativamente solo por la fracción biológicamente disponible del contenido total del metal en el suelo,

y no por la fracción que está secuestrada o irreversiblemente circunscrita a la matriz del mismo (Kim y col., 2007; Lanno y col., 2004). De acuerdo con esto, el contenido total del metal en sí mismo, es indicativo del nivel de saturación de los metales en la matriz del suelo y puede ser útil como primera impresión de contaminación o para el manejo de vertidos adicionales de metales. Sin embargo, no es suficiente para evaluar los efectos adversos que pueden provocar realmente los metales pesados en los ecosistemas del suelo (Aparicio, 2018).

El grupo de trabajo sobre biodisponibilidad de la Organización Internacional de Normalización, ISO/TC 190, publicó una guía para la selección y aplicación de métodos con el fin de evaluar la biodisponibilidad de metales en suelos (ISO 17402, 2008). La biodisponibilidad fue descrita en tres pasos conceptuales (Aparicio, 2018) (**Figura 1.1**):

1)- Disponibilidad ambiental (disponibilidad de metales pesados en el suelo): se refiere a la cantidad disponible del metal con respecto al contenido total del mismo en el suelo, incluyendo tanto la fracción disuelta en la fase acuosa del suelo como la fracción adsorbida a la matriz de suelo que se encuentra potencialmente disponible (ISO 17402, 2008). La fracción disponible del metal no debe considerarse como una fracción fija sino como una fracción variable, ya que depende también del tiempo. Debido a esto, varios científicos (Derz y col, 2012; Fedotov y col., 2012) diferenciaron la fracción disponible potencial en tres sub fracciones sobre la base de la cinética de desorción:

- a- fracción disuelta,
- b- fracción de desorción lenta (de semanas a meses) y
- c- fracción de desorción muy lenta (de meses a años).

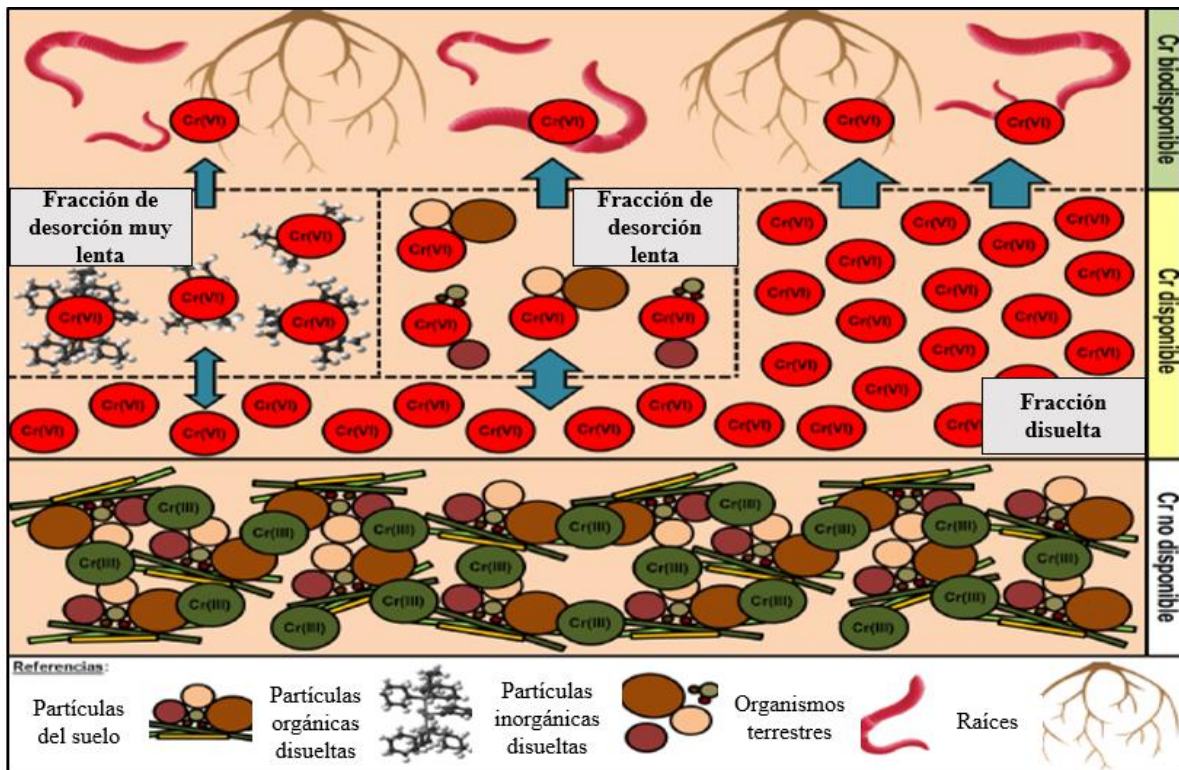
2)- Biodisponibilidad ambiental (metales pesados disponibles para ser incorporados por los organismos que habitan en el suelo): se define como la fracción de especies metálicas disueltas en la fase acuosa del suelo, que puede ser absorbida por las raíces de las plantas u otros organismos del suelo. En algunos casos, puede llegar a corresponderse con la disponibilidad ambiental (Kim y col., 2015).

3)- Biodisponibilidad toxicológica (acumulación y efecto toxicológico de los metales pesados dentro de los organismos): se refiere a la bioacumulación fisiológicamente inducida o efecto biológico del metal pesado en las plantas u otros organismos, y depende de una serie de procesos complejos incluyendo translocación, metabolismo y desintoxicación. (Sivakumar y Subbhuraam, 2005).

El conocimiento de estos términos permite entender el comportamiento del Cr en el suelo. Cuando el Cr(VI) entra en contacto con las partículas del suelo, es adsorbido por la materia orgánica y los minerales presentes. Sin embargo, debido a su elevada reactividad, es rápidamente reducido a Cr(III) (Ashraf y col., 2017). El Cr(III) resultante precipita como hidróxidos, frecuentemente co-precipitado con hidróxidos de Fe(III) y Al(III), y también puede coincidir con óxidos de Fe y Mn (Hausladen y Fendorf, 2017). Además, el Cr(III) interactúa con minerales de arcilla, como la caolinita y la montmorillonita, que son los que tienen mayor capacidad de fijación de metales en los suelos (Sandrin y Maier, 2003). La materia orgánica también es un componente clave del suelo y juega un papel importante en la biodisponibilidad del Cr, debido a su capacidad de reducir Cr(VI) a Cr(III) e intercambio catiónico, la cual aumenta la adsorción irreversible del Cr(III) al suelo (Shahid y col., 2017). Como consecuencia de los fenómenos descriptos, el Cr trivalente es retenido de manera irreversible en el suelo. Dicha fracción corresponde al Cr no disponible (Shahid y col., 2017).

Después de exceder el nivel de saturación en la matriz del suelo, el Cr(VI) no puede continuar reaccionando y la mayor parte del metal queda disuelto (fracción disuelta) (Kim y col., 2015). Por otro lado, una pequeña fracción queda adsorbida a partículas de la fase acuosa del suelo formando complejos con aniones inorgánicos (fracción de desorción lenta) y con partículas orgánicas (fracción de desorción muy lenta) (Blume y col., 2010). Estas tres fracciones corresponden al Cr(VI) disponible (Shahid y col., 2017).

La fracción de Cr(VI) disuelta es la que tiene un impacto directo sobre las especies vegetales y animales que habitan el suelo. La formación de complejos inorgánicos y orgánicos solubles reduce la disponibilidad del Cr(VI), ya que las especies acomplejadas son demasiado grandes para atravesar las membranas celulares (Wang y col., 2010).



**Figura 1.1.** Fracciones de Cr en suelo (tomado de Aparicio, 2018)

### 1.1.1.4 Cromo en plantas

Algunos estudios demostraron que pequeñas concentraciones de Cr tienen un efecto estimulante sobre el crecimiento y la productividad de las plantas (Zayed y Terry, 2003). Sin embargo, los efectos adversos de este metal son evidentes y se investigan cada vez más. Dentro de ellos se incluyen cambios fisiológicos y morfológicos que afectan la germinación, crecimiento, fotosíntesis y nutrición de la planta. (Shanker y col., 2005). Se demostró que el Cr(VI) reduce el número de células radiculares, debido a efectos citotóxicos y daño al ADN. Este metal también puede causar alteraciones en la ultraestructura de los cloroplastos y en la membrana plasmática generando necrosis de las hojas (Choudhury y Panda, 2005).

Los metales redox como el cromo, intervienen en la reacción de Fenton, conduciendo a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), lo que puede generar estrés oxidativo (Flora, 2009). Dentro de las EROs se destacan el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ).

La generación de EROs es un proceso que ocurre durante todo el ciclo ontogénico de las plantas. Por esta razón, existen sistemas antioxidantes que eliminan las EROs

protegiendo a las células de un posible daño oxidativo (Asada, 2006). Estos sistemas incluyen enzimas antioxidantes y moléculas antioxidantes no enzimáticas. Dentro de las enzimas se encuentran catalasa (CAT), peroxidasa (POD), glutatión reductasa (GR), ascorbato peroxidasa (APX) y superóxido dismutasa (SOD) (Choudhury y Panda, 2005; Shanker y col., 2005). Sin embargo, la generación excesiva de EROs, acompañada de un funcionamiento insuficiente del sistema antioxidante, puede conducir a un daño oxidativo a nivel de ADN, proteínas, y lípidos (Choudhury y Panda, 2005; Prado y col., 2012).

### 1.1.2 Plaguicidas

En las últimas décadas el hombre fabricó diversos compuestos químicos cuyas estructuras no están presentes en la naturaleza. Estos compuestos, denominados xenobióticos, son generalmente recalcitrantes. Dentro de estos compuestos se encuentran los plaguicidas.

El Código Internacional de Conducta Sobre la Distribución y Uso de Plaguicidas de la *Food and Agriculture Organization* (FAO) de las Naciones Unidas establece que un plaguicida «es la sustancia o mezcla de ellas, destinada a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo los vectores de enfermedad humana o animal; las especies no deseadas de plantas o animales que ocasionan un daño duradero u otras que interfieren con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte y comercialización de alimentos; los artículos agrícolas de consumo, la madera y sus productos, el forraje para animales o los productos que pueden administrárseles para el control de insectos, arácnidos u otras plagas corporales» (Ramírez y Lacasaña, 2001). Por lo tanto, los plaguicidas constituyen un grupo particular de biocidas (Ramírez y Lacasaña., 2001).

#### 1.1.2.1 Plaguicidas organoclorados

Los plaguicidas organoclorados (POs) son un grupo de compuestos orgánicos de síntesis, derivados de hidrocarburos, en los que uno o más átomos de hidrógeno son sustituidos por átomos de cloro (Arias Verdes y col., 1992).

Los POs poseen baja solubilidad en agua y alta solubilidad en solventes orgánicos, alta estabilidad frente a la foto-oxidación, estabilidad a la humedad, al aire y al calor; baja



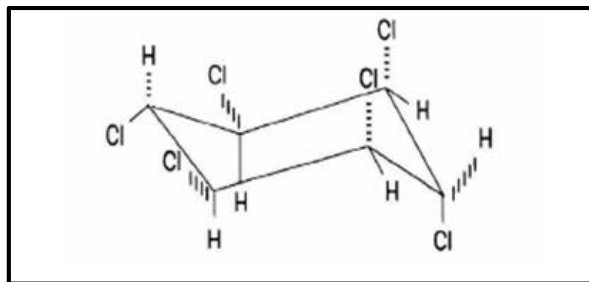
presión de vapor; y resistencia a la degradación por microorganismos (Arias Verdes y col., 1992).

Estos compuestos por su elevada liposolubilidad, tienen efectos adversos sobre los organismos, ya que se acumulan principalmente en los tejidos adiposos. Llegan, a través de la cadena alimenticia a animales superiores, incluyendo seres humanos (Arias Verdes y col., 1992).

## 1.1.2.2 Lindano

El lindano es un insecticida de amplio espectro, por lo que se utilizó en todo el mundo con diversos fines. Entre ellos, se destaca su uso en medicina veterinaria, fumigaciones de casas y áreas de almacenamiento comercial, control de parásitos en animales y en el control de una gran variedad de plagas como langostas, mosquitos, larvas, gorgojos, ácaros, termitas y hormigas (Bidlan y col., 2004).

Químicamente el lindano es el isómero gamma del 1, 2, 3, 4, 5, 6 - hexaclorociclohexano, denominado  $\gamma$ -HCH. En la **Figura 1.2** se observa la conformación silla, con tres átomos de cloro en posición axial y tres átomos de cloro en posición ecuatorial.



**Figura 1.2.** Estructura química del lindano. Isómero  $\gamma$ -hexaclorociclohexano ( $\gamma$ -HCH).

Existen ocho isómeros del HCH, designados  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y dos  $\alpha$ -enantiómeros, los cuales difieren en la orientación de los átomos de cloro unidos a los diferentes átomos de carbono. Existen dos formulaciones comerciales del HCH: lindano de grado puro (99% de  $\gamma$ -HCH) y lindano de grado técnico, este último es una mezcla de isómeros en la cual el  $\gamma$ -HCH es el ingrediente activo, debido a que es el compuesto con actividad insecticida más potente (Okeke y col., 2002).

Se demostró que el lindano puede causar efectos graves para la salud a corto y largo plazo. En mamíferos, la intoxicación aguda por lindano puede causar disfunción respiratoria, temblores generalizados, hipersalivación y convulsiones, y puede conducir a la muerte en casos extremos. Las exposiciones crónicas se relacionaron con daños renales, hepáticos y efectos adversos sobre los sistemas reproductivo, inmune, endócrino y nervioso (Caicedo y col., 2011; Salam y Das, 2012). También se reportó como potencial carcinogénico, teratogénico, genotóxico y mutagénico (ATSDR, 2011). Desde hace años la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer considera al lindano dentro de la lista de compuestos "carcinógenos para los humanos" (Grupo 1) (IARC, 2015).

La toxicidad del lindano se encuentra ampliamente documentada, por lo que actualmente más de 52 países, entre ellos Argentina, prohibieron o restringieron el uso de este xenobiótico (Vijgen y col., 2011). Sin embargo, a pesar de la prohibición del lindano y sus isómeros, la cual figura en el Registro de Químicos Prohibidos y Restringidos en Argentina 2016 (última actualización), los residuos de este plaguicida permanecen en el ambiente y fueron encontrados en agua, suelo, plantas y animales (Rodríguez-Rodríguez y col., 2013; Simón Solá y col., 2019).

### 1.1.2.3 Biodisponibilidad de contaminantes orgánicos en suelo

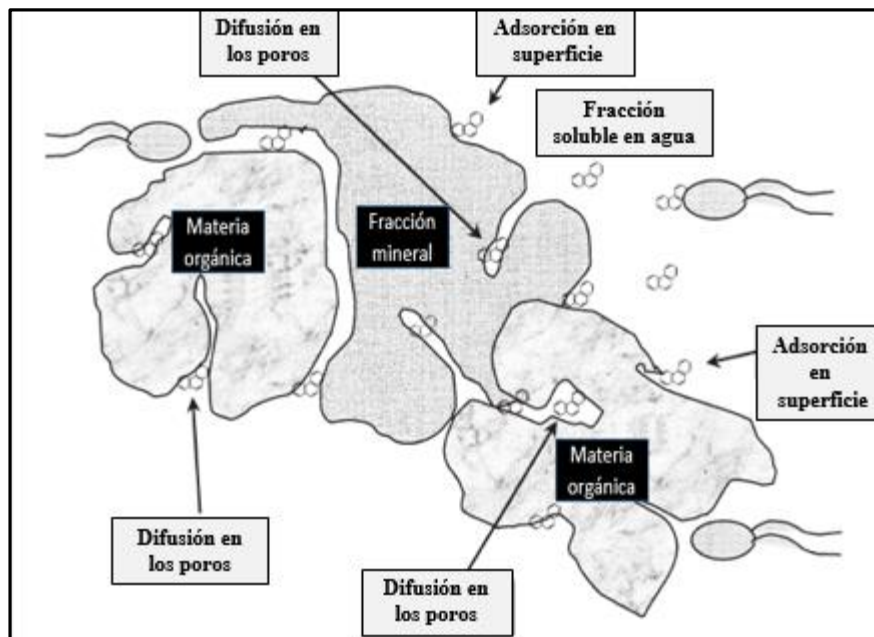
La biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos en suelo permite entender el riesgo que presenta para los organismos, así como también los medios necesarios para una remediación exitosa.

Los contaminantes orgánicos al ponerse en contacto con el suelo pueden ser biodegradados, lixiviados o volatilizados, conduciendo a la disminución en la concentración. Asimismo, pueden interactuar con la matriz del suelo (**Figura 1.3**). El destino y el comportamiento de los compuestos orgánicos hidrofóbicos dependerá de las características del suelo (contenido de materia orgánica, materia mineral, tamaño y estructura de los poros), y las características del contaminante (grado de solubilidad en fase acuosa y estructura química, etc.) (Reid y col., 2000).

Los compuestos orgánicos, y en particular aquellos débilmente polares, escasamente solubles en agua, con baja presión de vapor y una estructura molecular recalcitrante como el lindano, suelen ser retenidos o adsorbidos por las partículas orgánicas y minerales del suelo (Becerra-Castro y col., 2013). Como consecuencia del



secuestro de los contaminantes orgánicos por los componentes del suelo, se reduce la fracción del compuesto disponible para los organismos.



**Figura 1.3.** Fracción de lindano en suelo (tomada de Semple y col., 2003).

### 1.1.2.4 Plaguicidas en plantas

Numerosos estudios evaluaron el efecto tóxico de los compuestos orgánicos recalcitrantes sobre diferentes especies vegetales (Becerra-Castro y col., 2013; Chigbo y col., 2013).

El lindano ejerce efectos adversos sobre la germinación y desarrollo inicial de algunas especies vegetales. Estos compuestos pueden desestabilizar las vías metabólicas generales y de esta manera afectar el desarrollo y la fisiología de la planta (Pereira y col., 2010). Los plaguicidas organoclorados producen de manera indirecta alteraciones en el contenido de carbohidratos, aminoácidos y/o compuestos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

La exposición a estos compuestos orgánicos también puede conducir a incrementos en el contenido de ácidos grasos y a la oxidación de los mismos. Este efecto conduce a daños en la integridad y vitalidad de las células de las plantas (Blondel y col., 2017).

## 1.2 Biorremediación de sistemas co-contaminados

La contaminación del suelo con metales pesados y contaminantes orgánicos se convirtió en uno de los principales problemas de salud ambiental y humana en todo el mundo, debido a la rápida industrialización y urbanización.

Las tecnologías de remediación implican cualquier operación que altere las características de los desechos peligrosos o contaminantes para disminuir su toxicidad, volumen o movilidad, mediante la aplicación de procesos fisicoquímicos y/o biológicos (Corredor, 2013).

La remediación de suelos co-contaminados por compuestos orgánicos y metales pesados es un problema complejo, ya que los procesos químicos y las tecnologías de remediación son diferentes para cada grupo de contaminantes (Dong y col., 2013).

Los estudios sobre tecnologías de descontaminación simultánea son escasos, y en general se enfocan en estimular solo la degradación de los contaminantes orgánicos, mientras que la extracción del metal no es tomada en cuenta. Es por ello que resulta novedoso desarrollar tecnologías que lleven a cabo de manera eficiente ambos procesos (Puzon y col., 2002). En este sentido, los tratamientos biológicos reciben considerable atención como una herramienta biotecnológica eficaz para degradar, remover y/o transformar los residuos peligrosos de un sitio contaminado (Salinas y col., 2015). Estos tratamientos involucran el uso de diferentes organismos o sistemas, desde bacterias y hongos, hasta plantas y animales, o sus derivados (Wood, 2008). Estas tecnologías de remediación ecoamigables reciben el nombre de biorremediación.

## 1.3 Fitorremediación

La fitorremediación es una rama de la biorremediación e implica el uso de plantas para eliminar o estabilizar contaminantes (Sumiahadi y Acar, 2018). La fitorremediación involucra diferentes mecanismos por lo que puede clasificarse en: fitoextracción, fitovolatilización, fitodegradación, fitoestimulación, fitoestabilización y rizofiltración.

- Fitoextracción o fitoacumulación: en este proceso se aprovecha la capacidad de la planta para extraer del suelo el contaminante a eliminar y acumularlo en hojas y/o tallos. (Hammer y col., 2003).

- **Fitovolatilización:** es una forma especializada de fitoextracción, basada en la transferencia de contaminantes desde el suelo o agua hacia la atmósfera, actuando la planta extractora como intermediario. La planta capta, modifica el contaminante y lo libera a la atmósfera como transpiración.
- **Fitodegradación:** es una forma especializada de la fitoextracción, basada en la habilidad de ciertas plantas para metabolizar y/o degradar contaminantes orgánicos por acción de enzimas específicas en el interior de las células.
- **Fitoestimulación o rizodegradación:** basada en la degradación de compuestos orgánicos en el exterior de la planta. Es llevada a cabo en asociación con los microorganismos asociados que se desarrollan en el entorno radicular.
- **Fitoestabilización:** basado en la inmovilización de metales pesados en las raíces de plantas por absorción o acumulación, como así también por precipitación en la rizósfera. De esta manera disminuye la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes inorgánicos.

La fitorremediación presenta ventajas frente a otras técnicas de remediación, entre las que se puede citar:

- Se realiza “*in situ*”
- Se realiza en forma pasiva
- Usa energía solar
- Es rentable
- Es una tecnología amigable con el ambiente
- Produce menos emisiones al aire y al agua
- Nula o muy poca producción de contaminación secundaria
- Los sustratos permanecen en los sitios de descontaminación y son reutilizables

Sin embargo, presenta ciertas limitaciones entre las que se pueden citar:

- Limitada a suelos y/o aguas poco profundos
- Más lenta que los tratamientos convencionales
- Requiere una gran superficie para su funcionamiento
- Es posible que algunos de los contaminantes eliminados entren en la cadena trófica a través del consumo por animales e incluso el hombre (Sumiahadi y Acar, 2018).

## 1.3.1 Interacciones plantas-bacteria en fitorremediación

Las bacterias endofíticas y rizosféricas son de especial importancia en los procesos de rizodegradación. Las bacterias endofíticas colonizan los tejidos internos de las plantas, mientras que, las bacterias rizosféricas son habitantes de la interfase raíz-suelo (Becerra-Castro y col., 2012). Esta interfase se conoce como rizósfera, y se define como la estrecha zona de suelo que rodea la raíz (aproximadamente 1-2 mm de distancia). En esta asociación ambos organismos involucrados se ven beneficiados. Los microorganismos se benefician en presencia de las plantas debido a la mayor disponibilidad de nutrientes en la rizósfera. Esto se debe a que las plantas exudan diversos compuestos orgánicos a través de las raíces, que favorecen el crecimiento y actividad microbiana (He y Yang, 2007). Asimismo, las plantas reciben beneficios de algunas bacterias asociadas, denominadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés). Estas bacterias producen moléculas que promueven el crecimiento de las plantas y/o reducen el estrés. Además, las mismas pueden actuar directamente sobre el contaminante modificando su biodisponibilidad y/o remoción del suelo (Becerra-Castro y col., 2013).

### 1.3.1.1 Exudados radiculares

Las plantas exudan a través de las raíces una gran variedad de compuestos en la rizósfera. Entre ellos se incluyen iones, oxígeno libre, agua, enzimas, mucílagos, y una gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios que contienen carbono (Uren, 2000)

La exudación de las raíces se lleva a cabo por dos motivos principales: 1)- se produce la excreción de materiales de desecho, por medio de un gradiente dependiente y 2)- las plantas secretan compuestos con funciones importantes, tales como lubricación y defensa. Estos compuestos son liberados a través de las raíces por al menos dos mecanismos. 1)- a través de la membrana celular y 2)- desde células que constituyen el borde las raíces.

Según Curl y Truelove (1986), los productos exudados se clasifican en dos grupos: 1)- compuestos de bajo peso molecular, tales como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, compuestos fenólicos y otras metabolitos, los cuales representan la mayor diversidad de productos secretados;

2)- compuestos de alto peso molecular, tales como polisacáridos y proteínas, los cuales son menos diversos pero componen una mayor proporción de los exudados radiculares.

Claramente, la exudación de compuestos orgánicos representa un costo significativo de carbono para las plantas. La magnitud de los fotosintatos segregados como exudados, varía con el tipo de suelo, edad, estado fisiológico de la planta, y disponibilidad de nutrientes (Bais y col., 2006).

El "efecto rizosférico", descrito por primera vez por Hiltner (1904) postula que los microorganismos son atraídos por los nutrientes exudados por las raíces de las plantas. Los exudados radiculares (ERs) proveen una fuente rica en carbono aprovechable por la microbiota edáfica, aumentando la densidad, diversidad y/o actividad metabólica microbiana. Además los productos secretados pueden actuar como moléculas señales que inician una comunicación cruzada "*cross talk*" con los microorganismos del suelo. Asimismo, algunos microorganismos producen señales que inician la colonización de los tejidos vegetales.

En un contexto de fitorremediación, se demostró que la disipación de contaminantes orgánicos e inorgánicos es mayor en la rizósfera, en comparación a otras fracciones del suelo (Becerra-Castro y col., 2013; Kidd y col., 2008). Esto se atribuye al "efecto rizosférico". Asimismo, según Kidd y col. (2008), los compuestos vegetales secretados pueden estimular la degradación de un contaminante de diferentes maneras:

- 1)-facilitando su co-metabolismo,
- 2)-induciendo la expresión de genes microbianos que codifican enzimas degradativas,
- 3)-aumentando su biodisponibilidad y/o promoviendo su degradación por la liberación de enzimas vegetales,
- 4)- aumentando su biodisponibilidad debido a la actividad emulsificante de algunos productos vegetales

### **1.3.1.2 Efectos de las bacterias sobre el crecimiento de las plantas**

Las PGPB son microorganismos capaces de estimular el crecimiento vegetal por una variedad de mecanismos que actúan de manera directa o indirecta sobre las plantas (Becerra- Castro y col., 2012).

- 1)- Mecanismos directos: están asociados con un incremento en la biodisponibilidad de nutrientes en el suelo e incluye: fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato inorgánico

y producción de sideróforos. Las bacterias también pueden influir directamente en la fisiología de las plantas a través de la producción de fitohormonas o por la reducción de los niveles de estrés.

- Fijación de nitrógeno: algunos procariontes, conocidos como diazotrofos, son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico como amoníaco utilizando la enzima nitrogenasa. Esta fijación biológica de N es de suma importancia para la nutrición de las plantas (Beattie, 2007).

- Solubilización de fosfato inorgánico: el fósforo es el segundo macronutriente importante para el crecimiento vegetal. A menudo, este elemento es limitado en el suelo debido a que se presenta en forma no disponible, como compuestos de fósforo orgánico y fosfatos insolubles. En respuesta a la deficiencia de este nutriente las plantas pueden sufrir cambios morfológicos y fisiológicos. Muchas bacterias son capaces de convertir los fosfatos insolubles no disponibles presentes en el suelo, en formas solubles y accesibles para las plantas. Este proceso se lleva a cabo mediante la producción de ácidos orgánicos y/o de enzimas fosfatasas (Podile y Kishore, 2007; Richardson y Simpson, 2011).

- Producción de sideróforos: el hierro es relativamente abundante en el suelo, sin embargo, a menudo se encuentra presente como precipitados de Fe (III) insolubles (Bais y col., 2006). Este nutriente se considera esencial para los organismos, ya que actúa como cofactor de diversas enzimas implicadas en procesos metabólicos. En respuesta a la baja concentración de hierro disponible, algunos microorganismos producen y liberan agentes quelantes específicos de Fe (III), llamados sideróforos. Estos compuestos son metabolitos secundarios que pueden definirse como pequeñas moléculas (<1000 Da) que comprenden cadenas laterales y grupos funcionales con una fuerte afinidad para coordinar con el ión férrico (Schwyn y Neilands, 1987). Típicamente, los sideróforos microbianos se clasifican como catecolatos, hidroxamatos y  $\alpha$ -carboxilatos, dependiendo de la naturaleza química de sus sitios de coordinación con el hierro. Las bacterias productoras de sideróforos pueden aumentar la disponibilidad de hierro favoreciendo la nutrición de las plantas o inhibiendo la colonización de fitopatógenos (Crowley, 2006).

- Fitohormonas: las hormonas vegetales están involucradas en varias etapas del crecimiento y desarrollo de las plantas. Algunos microorganismos sintetizan fitohormonas tales como auxinas, citoquininas y giberelinas, y por lo tanto, en asociación con las plantas puede inducir cambios en la morfología y fisiología de las mismas (Persello-Cartieaux y col., 2003). La síntesis bacteriana del ácido indolacético (AIA),

perteneciente al grupo de las auxinas, es probablemente la más estudiada. El AIA es un metabolito derivado principalmente del triptófano (Trp). En los microorganismos se describieron al menos tres vías metabólicas para la biosíntesis del AIA, denominadas vía del indol 3-pirúvico (AIP), ácido 3-acetamida (AIM) y vía de la triptamina (Tam) (Aguilar-Piedras y col., 2008). El AIA producido tanto por las bacterias como por las plantas, puede estimular la proliferación celular, la elongación celular o inducir la transcripción de la enzima ACC sintasa, que cataliza la formación del precursor 1-aminociclopropano-1- carboxilato (ACC) (Vessey, 2003). Sin embargo, la concentración de AIA disponible para la planta es un factor importante que determina su efecto global. A menudo una sobreproducción de la auxina puede generar efectos negativos en el crecimiento vegetal. Este efecto del AIA parece estar relacionado a la síntesis de la enzima ACC sintasa, la cual está implicada en la producción de etileno en las plantas (Persello-Cartieaux y col., 2003).

- **Modulación de los niveles de etileno.** el etileno es una hormona gaseosa que juega un papel importante en la iniciación y elongación de la raíz, nodulación, senescencia, abscisión y maduración vegetal. Sin embargo, cuando las plantas se exponen a condiciones de estrés, producen altos niveles de esta hormona causando lo que se conoce como “estrés del etileno” (Glick y col., 2007). El exceso de etileno puede generar efectos adversos en las plantas, entre ellos, inhibir el alargamiento de la raíz. Glick y col. (1998) desarrollaron un modelo para explicar cómo las bacterias capaces de producir la enzima ACC desaminasa puede disminuir la producción de etileno. El ACC es el precursor inmediato en la síntesis del etileno. La enzima bacteriana ACC desaminasa hidroliza el ACC exudado por las plantas en la rizósfera, a amoníaco y  $\alpha$ -cetoglutarato. En un intento por mantener el equilibrio entre los niveles de ACC interno y externo, las plantas tienden a exudar más de este precursor y reducir la síntesis de etileno dentro de la célula vegetal. A su vez, las bacterias productoras de la enzima ACC desaminasa utilizan el ACC como fuente de  $N_2$  (Glick y col., 1998; Persello-Cartieaux y col., 2003).

2- Mecanismos indirectos: son aquellos que inhiben o reducen las enfermedades de las plantas por patógenos. Las bacterias con estas funciones a menudo se denominan como agentes de control biológico. Estos microorganismos compiten por los nutrientes y espacio produciendo compuestos antimicrobianos o induciendo mecanismos de defensa en las plantas (Compant y col., 2005; Lemanceau y col., 2007; Podile y Kishore, 2007).

- Competencia por los nutrientes: un claro ejemplo, es la competencia por el hierro. Algunos autores demostraron que la producción de sideróforos por PGPB privan a los patógenos de este elemento esencial, inhibiendo su crecimiento (Compant y col., 2005).
- Antibiosis: es utilizado por varias bacterias como mecanismo de control. Entre los compuestos con capacidad de control biológico se incluyen compuestos antimicrobianos, biosurfactantes y enzimas quitinolíticas (Lemanceau y col., 2007).
- Resistencia sistémica inducida (ISR): algunas cepas bacterianas pueden activar/estimular mecanismos de defensa de la planta sin causar síntomas visibles de estrés en el huésped vegetal. Entre los determinantes bacterianos de ISR se incluyen lipopolisacáridos, sideróforos y ácido salicílico (Van Loon y col., 1998).

### 1.3.1.3 Efectos de las bacterias sobre la biodisponibilidad de los contaminantes

La movilidad y biodisponibilidad de los metales pesados en el suelo son factores críticos que afectan la eficiencia de los procesos de fitorremediación. La movilización de los contaminantes inorgánicos por acción de las bacterias se puede atribuir a la acidificación del entorno, quelación o complejación de los metales, transformación química y reacciones de óxido- reducción.

- Acidificación: los ácidos orgánicos producidos por las PGPB, conducen a la acidificación del medio. Este efecto puede solubilizar el metal desde la fase sólida, o afectar el estado de oxidación del mismo en la fase acuosa (Gadd, 2010).
- Complejación: los ácidos orgánicos, sideróforos o biosurfactantes pueden formar complejos con los metales de la fase acuosa, y así, promover la desorción de los metales de la fase sólida del suelo (Colin y col., 2012; Dimkpa y col., 2009). Además, pueden causar la desorción por contacto directo con el metal adsorbido (Colin y col., 2012).
- Transformaciones redox: los microorganismos pueden reducir metales como el Fe (III) y Mn (IV) aumentando su solubilidad. Asimismo, la reducción de estos metales puede liberar indirectamente otros metales que están fuertemente unidos a los óxidos de Fe y Mn (Gadd, 2010).

La biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos en los suelos también resulta un factor importante para lograr un efectivo proceso de fitorremediación (Chaudhry y col., 2005). Las bacterias pueden incrementar la biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos, facilitando así su degradación (Pandey y Jain, 2009; Wenzel, 2009). Este es



particularmente el caso de los contaminantes con baja hidrofobicidad. Entre los principales mecanismos utilizados en este proceso se describen la producción de emulsificantes y ácidos orgánicos.

### **1.4 Especie vegetal en procesos de fitorremediación de suelos co- contaminados**

En un proceso de fitorremediación, es de gran importancia la selección cuidadosa de la especie vegetal. La naturaleza fitotóxica de los contaminantes puede inhibir el crecimiento vegetal de la planta, y así reducir la eficiencia del proceso de remediación (Becerra-Castro y col., 2012).

La fitorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos e inorgánicos puede ser abordada por las plantas mediante diferentes procesos. Con respecto a la remediación de suelos contaminados con metales pesados, una de las estrategias básicas es la fitoextracción (Krämer, 2005). Las plantas hiperacumuladoras son capaces de crecer en ambientes con elevadas concentraciones de metales y concentrar altos niveles de los mismos en su biomasa aérea (Pollard y col., 2014). Sin embargo, la mayoría de estas especies presentan baja producción de biomasa (Brunetti y col., 2011; Dickinson y col., 2009). Por ello, una alternativa es el uso de cultivos tolerantes a metales pesados y productores de gran biomasa vegetal. La planta de maíz fue propuesta por diversos autores para ser empleada en fitorremediación, por su tolerancia y capacidad de acumular diferentes metales pesados (Fellet y col., 2007; Luo y col., 2005).

La fitorremediación de compuestos orgánicos tóxicos se basa principalmente en el efecto de los exudados radiculares (Lin y col., 2008). La fitoestimulación de los microorganismos degradadores de plaguicidas, como así también, la fitodegradación por algunas enzimas secretadas, son estrategias exitosas para la remediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos (Gao y col., 2010). El maíz, es una especie vegetal que se adapta fácilmente a las condiciones ácidas que se generan durante la degradación de POs (Benimeli y col., 2012), además de haberse registrado actividad de clorinasa en los exudados radiculares de ciertas variedades de la especie (Álvarez y col., 2012).

La planta de maíz resulta una especie vegetal promisoría para ser usada en técnicas de fitorremediación de sitios co-contaminados con Cr(VI) y lindano. El maíz es un cultivo de cereal versátil que se cultiva ampliamente en todo el mundo en una variedad de

ambientes agroecológicos. Se caracteriza por ser una planta de crecimiento rápido y de estructura vigorosa y alta (2-3 m). Sus hojas son amplias (5-10 cm) y largas (50-100 cm). La raíz presenta un aspecto fuerte con numerosas raíces adventicias. Normalmente presenta un solo tallo que soporta hasta 30 hojas. Además el maíz es capaz de tolerar condiciones ambientales adversas y crear condiciones ambientales favorables para los microorganismos del suelo (Lin y col., 2008).

### **1.5 Actinobacterias útiles en procesos de bio/fitorremediación**

Las actinobacterias son ampliamente estudiadas como candidatas para la biorremediación de diferentes compartimientos ambientales contaminados con tóxicos orgánicos e inorgánicos (Álvarez y col., 2017). En este sentido, nuestro grupo de trabajo del “Laboratorio de Biotecnología de Actinobacterias”, estudia a este grupo de microorganismos desde hace más de 15 años debido a su capacidad para biorremediar metales pesados y/o pesticidas (Álvarez y col., 2017; Aparicio y col., 2015; Fuentes y col., 2010; Polti y col., 2009).

El *Phylum* Actinobacteria incluye 6 clases, 23 órdenes, 54 familias y 255 géneros (Goodfellow y col., 2012). Las actinobacterias representan un grupo ubicuo de microorganismos ampliamente distribuidos en los ecosistemas naturales (Ghanem y col., 2000). Son bacterias Gram-positivas o Gram-variables, con una pared celular rígida que contiene ácido murámico y ampliamente reconocidas por su alto contenido de bases guanina más citosina (G+C) en su ADN (55-75 mol%). Este paradigma se rompió recientemente debido a que se encontraron actinobacterias de agua dulce con bajo contenido de G+C en sus genomas (Ghai y col., 2012). Las actinobacterias incluyen organismos fenotípicamente diversos que exhiben una amplia variedad de morfologías que van desde células cocoides o coco-bacilares hasta hifas fragmentadas o micelio altamente diferenciado y ramificado. Poseen diversas propiedades fisiológicas y metabólicas, tales como la producción de enzimas extracelulares y la formación de una amplia variedad de metabolitos secundarios con actividad biológica, tales como antibióticos, antivirales, anticancerígenos, inmunosupresores, y otros compuestos de interés industrial (Adegboye y Babaloba, 2012; Ventura y col., 2007).

Las actinobacterias se distribuyen ampliamente en ambientes terrestres y acuáticos. También se conocen actinobacterias endófitas capaces de generar efectos beneficiosos y/o adversos en plantas (Hasegawa y col., 2006).

La literatura describe abundantes casos de biorremediación llevados a cabo por actinobacterias pertenecientes al género *Streptomyces* (Álvarez y col., 2017). Las bacterias de este género se caracterizan por formar un micelio de sustrato extensamente ramificado y un micelio aéreo. Este último forma cadenas de esporas en la madurez. Sus colonias, inicialmente, muestran una superficie lisa, pero luego desarrollan una trama de micelio aéreo que puede aparecer flocoso, granular, pulverulento, o aterciopelado. Producen una gran variedad de pigmentos responsables del color del micelio vegetativo y aéreo. Las cepas de *Streptomyces* sp. se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo y utilizan una amplia variedad de compuestos orgánicos como única fuente de carbono. La temperatura óptima para la mayoría de las especies pertenecientes a este género está comprendida en el rango de 25-35 °C, sin embargo, algunas cepas pueden ser psicrófilas o termófilas. El rango óptimo de pH para el crecimiento es 6.5-8.0 (Kämpfe y Kroppenstedt, 1991).

En materia de la aplicación de *Streptomyces* en procesos de fitorremediación, el prospecto es muy alentador, ya que durante los últimos años se documentaron investigaciones con resultados muy promisorios (Álvarez y col., 2012, 2015, 2017; Simón Solá y col., 2017, 2019, Polti y col., 2011).

### 1.6 Bioindicadores

Para evaluar si un proceso de biorremediación fue exitoso, es conveniente determinar si los compuestos producidos al final de la intervención biológica son más o menos tóxicos que el contaminante parental. Para ello, distintos sistemas vivos pueden ser empleados como bioindicadores (Repetto y col., 2001). Estos son sistemas biológicos, tales como invertebrados, microorganismos, y/o plantas, muy sensibles ante cambios del ambiente. Por ello, su uso resulta extremadamente útil en el monitoreo de procesos de biorremediación (Atlas y Bartha, 2002).

Entre los organismos usados comúnmente como bioindicadores, se encuentran las plántulas de lechuga (*Lactuca sativa*)

*Lactuca sativa* es una especie de fácil y rápida germinación por lo que es posible desarrollar la prueba en pocos días. Este ensayo de toxicidad fue recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y compuestos puros (US EPA, 1989; Wang, 1995). La sensibilidad de *Lactuca sativa*, el reducido tiempo de exposición de la prueba con semillas, los bajos costos asociados y que no requiere equipamiento sofisticado, convierten a este bioensayo en una elección ideal para su aplicación en el monitoreo de procesos de detoxificación y saneamiento de muestras ambientales (Sobrero y Ronco y col., 2004).

En base a lo precedentemente expuesto, el desarrollo de sistemas aptos para la biorremediación, donde los microorganismos interactúen con plantas, está siendo considerado cada vez más como la mejor alternativa para superar las debilidades propias del uso de los organismos (microorganismos o plantas) de manera independiente.

Por este motivo, partiendo de la siguiente hipótesis **“los procesos de biorremediación de sistemas co-contaminados con plaguicidas organoclorados y metales pesados pueden ser mejorados empleando actinobacterias combinadas con especies vegetales”**, se planteó el siguiente objetivo general de trabajo, y los correspondientes objetivos específicos.

### OBJETIVO GENERAL

“Evaluar la remoción de metales pesados y/o plaguicidas organoclorados por actinobacterias y especies vegetales cultivadas en sistemas contaminados”

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1°- Aislamiento de actinobacterias desde especies vegetales desarrolladas naturalmente en sitios contaminados y evaluación de la remoción de lindano y/o Cr(VI) por dichos microorganismos.
- 2°- Evaluación de la remoción de lindano y/o Cr(VI) por especies vegetales completas y por sus productos (exudados radiculares).
- 3°- Identificación molecular de las actinobacterias seleccionadas y evaluación de sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal.
- 4°- Estudio de la remoción de lindano y/o Cr(VI) por el sistema microorganismo-vegetal seleccionado (la/s actinobacterias y la especie vegetal seleccionada).
- 5°- Evaluación de la efectividad del proceso de biorremediación mediante ensayos de ecotoxicidad.

**MATERIALES**  
**Y**  
**MÉTODOS**

### 2.1 Medios de cultivo

**Tabla 2.1.** Medio de cultivo para el aislamiento, crecimiento y conservación de cepas.

<b>Caseína Almidón Agar (CAA)*</b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>
<b>Almidón</b>	10
<b>Caseína</b>	1
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0,5
<b>Agar</b>	15

\*pH 7 con NaOH y/o HCl (Amoroso y col., 1998)

Este medio de cultivo además fue utilizado para la producción de esporos empleados en los bioensayos en medio mínimo líquido.

**Tabla 2.2.** Medio de cultivo para la producción de inóculos empleados en la identificación molecular y bioensayo en suelo.

<b>Tripteína Soja Caldo (TSB)*</b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>
<b>Tripteína</b>	17
<b>Peptona de soja</b>	3
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	2,5
<b>NaCl</b>	5
<b>Glucosa</b>	2,5

\*pH 7 con NaOH y/o HCl

**Tabla 2.3.** Medios de cultivo para ensayos de tolerancia y de remoción de contaminantes.

Medio Mínimo (MM)*	g L <sup>-1</sup>
L-asparagina	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub>	0,2
FeSO <sub>4</sub>	0,01
Agar**	15

\*pH a 7 con NaOH y/o HCl (Hopwood y col., 1985).

\*\*El agar se agregó al trabajar con MM sólido

Según el ensayo el MM fue suplementado con diferentes concentraciones de glucosa: 1 g L<sup>-1</sup> (MM<sub>1</sub>), 5 g L<sup>-1</sup> (MM<sub>5</sub>) o 10 g L<sup>-1</sup> (MM<sub>10</sub>).

**Tabla 2.4** Medio para el cultivo de plantas de maíz.

Solución nutritiva Hoagland*	
KNO <sub>3</sub>	1,5 mM
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,50 mM
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 mM
EDTA-Fe	1,9 M
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,5 M
MnSO <sub>4</sub>	1,25 M
ZnSO <sub>4</sub>	0,21 M
CuSO <sub>4</sub>	0,75 M
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,02 M

\*pH a 7 con NaOH (Hoagland, 1937).

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1 atm de sobrepresión, durante 15 minutos.



### 2.2 Soluciones de contaminantes

Se prepararon las siguientes soluciones de contaminantes para utilizarlas en los diferentes ensayos realizados:

1)- una solución madre de  $5 \text{ g L}^{-1}$  de Cr(VI) como  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (Cicarelli, Argentina). La solución se esterilizó por filtración, utilizando filtros Millipore de  $0,22 \mu\text{m}$ .

2)- dos soluciones madre de diferentes concentraciones:  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$  y  $400 \text{ mg ml}^{-1}$  de lindano (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Como solvente se utilizó acetona.

### 2.3 Colecta de muestras

Se recolectaron muestras de suelo libre de vegetación, rizósfera y plantas herbáceas y leñosas de diez fenotipos diferentes, en un sitio próximo a una estación de ferrocarril en la localidad de Argentina, Santiago del Estero (**Figura 2.1**). En los años 90 se encontró en este lugar el depósito clandestino más grande de plaguicidas de Sudamérica, con más de 30 toneladas de HCH y otros compuestos organoclorados (principalmente DDT). El mismo fue eliminado en el año 2004 (Benimeli, 2004).

Las muestras de suelo se colectaron en tres puntos separados entre sí por 5 m. Se obtuvieron a una profundidad de entre 5 y 15 cm y se conservaron en recipientes plásticos estériles a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta el momento de estudio, rotuladas como muestra A, B y C.

Por otra parte, se colectaron individuos de diez especies vegetales incluyendo la porción de suelo circundante a la raíz. Previamente, al transplante de las especies vegetales a macetas plásticas para su posterior trasladado a un invernadero, se tomaron muestras de raíces de las plantas recolectadas. Se consideró como rizósfera al suelo que quedó adherido a las raíces luego una agitación vigorosa, el cual se recuperó raspando cuidadosamente con un pincel (Smalla y col., 2001).



**Figura 2.1** Ubicación de la localidad de Argentina (Santiago del Estero) (tomado de Google Maps).

### 2.4 Aislamiento de actinobacterias

#### 2.4.1 A partir de muestras de suelo libres de vegetación y muestras de rizósfera

Las muestras de suelo libre de vegetación y rizósfera se secaron a temperatura ambiente y se tamizaron a través de un tamiz de 4 mm. A continuación se colocó 1 g de muestra en frascos estériles de 50 ml y se adicionó 9 ml de una solución de hexametáfosfato de sodio estéril (1%). Se agitó durante 30 minutos en un agitador rotatorio, para obtener de esta manera la primera dilución de la serie ( $10^{-1}$ ). Luego se realizaron diluciones sucesivas con agua destilada estéril. Se sembraron 100  $\mu$ l de las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  en placas de Petri con medio CAA suplementado con 10  $\mu$ g  $L^{-1}$  de ácido nalidíxico y 10  $\mu$ g  $L^{-1}$  de cicloheximida (Ravel y col., 1998) para disminuir la carga microbiana. La siembra se realizó por diseminación en superficie con espátula de Drigalsky, por triplicado. Las placas de Petri se incubaron a 30 °C durante 7 días (Fuentes y col., 2011). Las colonias aisladas se recuperaron y se sembraron en medio CAA sin

antibióticos, seleccionándolas según características compatibles con actinobacterias del género *Streptomyces*, tales como morfología, color y presencia de pigmentos difusibles (Lechevalier, 1989).

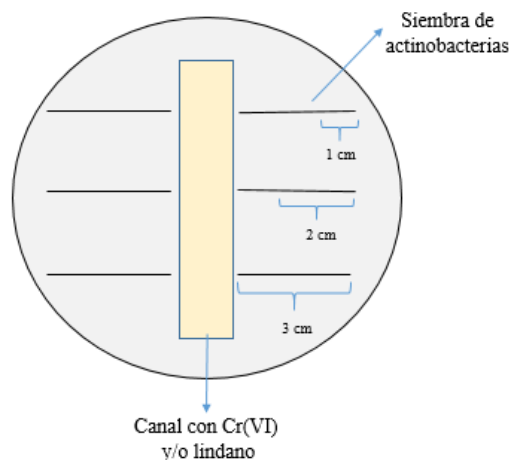
### 2.4.2 A partir de especies vegetales

Las plantas recolectadas se separaron en hojas, tallos y raíces. Se lavaron con agua corriente y se cortaron en trozos pequeños de 4x4 mm. Las piezas de tejido se enjuagaron sucesivamente con Tween 20 al 0,1 % durante 30 segundos; hipoclorito de sodio 1 % durante 5 minutos, y finalmente se enjuagaron durante 5 minutos con agua destilada estéril. A continuación, las muestras se esterilizaron superficialmente con etanol 70% durante 5 minutos (Taechowisan y col., 2003). Posteriormente, las piezas de tejidos vegetales se secaron en un flujo laminar, se transfirieron a placas de Petri con CAA suplementado con 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de ácido nalidíxico y 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cicloheximida y se incubaron a 30 °C durante 7 días. Las colonias aisladas se recuperaron, y se sembraron en medio CAA sin antibióticos seleccionándolas según características compatibles con actinobacterias del género *Streptomyces* (Fuentes y col., 2010; Lechevalier, 1989). Finalmente, las bacterias se conservaron a -80° C en medio de cultivo suplementado con 15% (v/v) de glicerol.

### 2.5 Evaluación cualitativa de tolerancia a Cr(VI) y/o lindano

Para realizar este ensayo se siguió la técnica desarrollada por Amoroso y col. (1998) basada en la inhibición del crecimiento de microorganismos en un medio de cultivo mínimo sólido, en presencia de Cr(VI) y/o lindano. Se realizaron canales en el centro de placas de Petri con MM<sub>10</sub> agarizado, retirando asépticamente la porción del medio. Las bacterias previamente aisladas se sembraron por estriado (3 cm de longitud) en forma perpendicular al canal y a cada lado del mismo. La base de los canales fue sellada con medio agua-agar y luego se colocó una solución de Cr(VI) de 250 mg L<sup>-1</sup> y/o 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  de lindano (**Figura 2.2**). Las placas se incubaron a 30 °C durante 7 días. El crecimiento microbiano a lo largo del estriado se usó como parámetro cualitativo de tolerancia a los contaminantes. Para el control del crecimiento, se realizaron siembras en placas con CAA con agua destilada estéril en lugar de Cr(VI) o lindano. Los resultados se registraron

utilizando tres categorías de acuerdo con el crecimiento a lo largo del estriado: bajo crecimiento (<1 cm), buen crecimiento (entre 1-2 cm) y crecimiento abundante (> 2 cm).



**Figura 2.2.** Esquema para la realización del análisis cualitativo de tolerancia a Cr(VI) y/o lindano en medio mínimo sólido.

### 2.6 Preparación de inóculos microbianos

Se preparó una suspensión de esporos de acuerdo a la metodología descrita por Kieser y col. (2000). Las bacterias seleccionadas según su tolerancia a los contaminantes evaluados, se sembraron por diseminación en superficie en placas de Petri con medio CAA. Luego de 7 días de incubación a 30 °C, se colocaron 10 ml de agua destilada estéril en cada caja y los esporos se desprendieron suavemente de la superficie de las placas con un ansa estéril y se retiró la suspensión formada con pipeta estéril. La suspensión de esporos se filtró usando un dispositivo como el descrito en Kieser y col. (2000). El filtrado se colocó en un tubo de centrifuga y agitó vigorosamente en agitador mecánico para romper las cadenas de esporos. Se centrifugó a  $10000 \times g$  durante 10 minutos a 4 °C y se separó el sobrenadante, a fin de remover todos los compuestos solubilizados a partir del medio de cultivo, los cuales podrían reducir la longevidad de los esporos o inhibir su germinación. Los esporos recogidos a partir de la siembra de 4 placas de Petri con medio CAA, se resuspendieron en 1 ml de agua destilada estéril.

Para determinar la concentración de esporos presentes en la suspensión obtenida, se realizaron diluciones decimales sucesivas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) y se sembraron 100  $\mu$ l de cada dilución en medio CAA por diseminación en superficie. Las placas de Petri se incubaron a 30 °C durante 7 días. Finalmente se realizó el recuento de colonias y determinó la

concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC mL}^{-1} = \text{N}^{\circ} \text{ de colonias} * \frac{1}{\text{dilución}} * 10$$

**UFC ml<sup>-1</sup>:** Unidades Formadoras de Colonias por ml

**N° de colonias:** recuento de colonias en placas que contenían entre 30 y 300 colonias

**Dilución:** dilución sembrada en la placa en la cual se realizó el recuento

Finalmente, se ajustó el volumen final de las suspensiones de esporos para lograr la concentración deseada (10<sup>9</sup> UFC ml<sup>-1</sup>) (Polti y col., 2007).

Por otra parte, se preparó una suspensión de células vegetativas. Para ello, los microorganismos se desarrollaron en frascos de vidrio de 125 ml con 30 ml de medio TSB. Los frascos fueron incubados en un agitador rotatorio a 200 rpm y 30 °C. Luego de 72 hs, se centrifugó a 12000 *x g* durante 10 minutos. La biomasa se recuperó, lavó dos veces con agua destilada estéril, se determinó peso húmedo y finalmente se resuspendió en una cantidad determinada de agua estéril para obtener una concentración de biomasa final de 0,1 g ml<sup>-1</sup>.

### 2.7 Identificación molecular de las cepas seleccionadas

Las suspensiones de células vegetativas de las cepas se obtuvieron según lo descrito en el **punto 2.6.2**. El ADN se aisló usando el procedimiento descrito por Polti y col. (2007), que incluye el uso de Triton X-100, perlas de vidrio, dodecilsulfato de sodio y posterior purificación del ADN por extracción con fenol/cloroformo.

El ADN genómico total se usó como templado para las amplificaciones por PCR. Las amplificaciones se realizaron en 25 µL de volumen de reacción usando cebadores universales 16S: 63 *forward* (50-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-30) y 1389 *reverse* (50-ACG GGC GGT GTG TAC AAG-30) (Brosius y col., 1978). Las reacciones de PCR del ADNr 16S se llevaron a cabo en un ciclador térmico automático GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.).

Los fragmentos amplificados se purificaron utilizando los sistemas de purificación de ADN Prep-A-Gene (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La secuenciación de ADN se llevó a cabo por MacroGen Services. Las secuencias se compararon y alinearon con las secuencias de la base de datos del GenBank utilizando el programa BLAST del servidor de red del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 2.8 Evaluación de las propiedades promotoras del crecimiento vegetal

Se determinó en las cepas seleccionadas la presencia de diversas características promotoras del crecimiento vegetal tales como: capacidad de solubilización de fosfato inorgánico, producción de sideróforos, producción de ácido indolacético, actividad ACC desaminasa. A continuación se mencionan las metodologías empleadas para la determinación de las diferentes características:

**-Solubilización de fosfato inorgánico:** La capacidad para solubilizar fosfato inorgánico se evaluó en placas de Petri con MM<sub>10</sub> agarizado modificado (sin K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) suplementado con 5 g L<sup>-1</sup> de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. A continuación, las placas de Petri se inocularon con 20 µl de la suspensión de biomasa de células vegetativas (0,1 g ml<sup>-1</sup>) de las cepas seleccionadas. Las placas se incubaron a 30 °C durante 7 días. Se utilizó como control positivo la bacteria *Azospirillum brasilense*. Un halo claro alrededor de la colonia bacteriana indicó la solubilización del fosfato mineral (Khadraji y col., 2017).

**-Producción de sideróforos:** La producción de sideróforos se detectó en placas de Petri con agar- Chrome Azurol S (CAS), utilizando el método descrito por Schwyn y Neilands (1987) con modificaciones. Todo el material de vidrio utilizado en este ensayo se limpió previamente con ácido clorhídrico concentrado seguido por el lavado con agua destilada, para eliminar posibles restos de hierro presente.

Para la preparación del medio agar-CAS, se disolvió en un vaso de precipitación 60,5 mg de CAS en 50 ml de agua destilada (la solución adquirió una coloración rojiza). A continuación, se adicionó 10 ml de una solución de FeCl<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O 1 mM y KOH 10 % con agitación, esta solución se añadió lentamente a 72,9 mg de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) disuelto en 40 ml de agua destilada. La solución

resultante de coloración verde- azulada, se esterilizó por vapor fluente durante 20 minutos.

Paralelamente, se preparó 120 ml de MM<sub>10</sub> modificado (sin FeSO<sub>4</sub>), al cual se adicionó 4,58 g de buffer PIPES (pH 6,8) y KOH puro con agitación para su disolución; y se llevó a 135 ml con MM<sub>10</sub>. El medio obtenido se esterilizó en autoclave (121 °C, 1 atm de sobrepresión, durante 15 minutos).

Finalmente, 15 ml de la solución colorante verde-azulada se agregaron al MM<sub>10</sub>+PIPES, con suficiente agitación para lograr la mezcla sin generación de espuma y se colocó 20 ml de agar CAS en placas de Petri. Las mismas se inocularon con 20 µl de la suspensión de biomasa de células vegetativas (0,1 g ml<sup>-1</sup>) de las cepas seleccionadas e incubaron a 30 °C durante 7 días.

Se utilizó como control positivo *Azospirillum brasilense*. La producción de sideróforos se detectó por el cambio de color del agar CAS de verde- azulado a anaranjado con la aparición de un halo alrededor de las colonias.

**-Producción de ácido indolacético:** La capacidad de producir ácido indolacético (AIA) se evaluó en frascos de 125 ml con MM<sub>10</sub> suplementado con triptófano. Para ello, MM<sub>10</sub> se suplementó con 3 concentraciones de triptófano (0,5, 2 y 5 g L<sup>-1</sup>) y se inocularon con 100 µl de la suspensión de biomasa de células vegetativas (0,1 g ml<sup>-1</sup>) de las cepas seleccionadas. Después de 5 días de incubación en agitador rotatorio a 200 rpm y 30 °C en oscuridad, los cultivos se centrifugaron y se recuperaron los sobrenadantes. A continuación, se hizo reaccionar 5 ml del sobrenadante con 0,5 ml de reactivo de Salkowski (1 g L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>, 28,5 ml de agua, 22 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) durante 30 minutos a 25 °C y en oscuridad. La producción de indoles se reconoció por la presencia de coloración rosada y evaluó espectrofotométricamente a 540 nm. Se empleó AIA puro para realizar una curva de calibración estándar. (Ameur, 2012)

**-Actividad de la enzima ACC desaminasa:** La actividad de la enzima ACC desaminasa se evaluó en placas de Petri con MM<sub>10</sub> agarizado modificado (sin L-asparagina) suplementado con ACC como fuente de nitrógeno, de acuerdo al método descrito por Glick (1995). Una solución de ACC (0,5 M) (Sigma Chemical Co., U.S.A.) se esterilizó por filtración (Millipore, 0,22 µm) y congeló a -4 °C.

Se colocó en placas de Petri 20 ml del MM<sub>10</sub> adicionado con 3 mM de ACC y finalmente se sembró 20 µl de la suspensión de biomasa de células vegetativas (0,1 g ml<sup>-1</sup>) de las cepas seleccionadas. Las placas se incubaron a 30 °C durante 7 días. Se utilizó como control positivo MM<sub>10</sub> suplementado con L-asparagina como fuente de nitrógeno. El crecimiento microbiano en el medio de cultivo suplementado con ACC como única fuente de nitrógeno indicó actividad ACC desaminasa.

### **2.9 Tratamiento de semillas de maíz (*Zea mays*) para la obtención de exudados de raíz**

El maíz es un cultivo capaz de crecer adecuadamente en condiciones hidropónicas y secretar abundantes exudados radiculares (Álvarez y col., 2012).

#### **2.9.1 Esterilización superficial de las semillas**

Las semillas de maíz se esterilizaron superficialmente siguiendo el protocolo descrito por Somasegaran y Hoben, (1994). Para ello se realizaron lavados secuenciales con las siguientes soluciones:

- Lavado inicial con H<sub>2</sub>O destilada
- Etanol 70 %. Se agitó enérgicamente y se dejó reposar 30-60 segundos
- HgCl<sub>2</sub> 0,1 %. Se dejó reposar 10 minutos.
- H<sub>2</sub>O destilada estéril. Se realizaron lavados sucesivos en condiciones de esterilidad.

Las semillas se secaron en flujo laminar y se conservaron a temperatura ambiente, al abrigo de la luz.



### 2.9.2 Germinación de semillas

Una vez esterilizadas superficialmente, las semillas se cultivaron en grupos de aproximadamente 5 unidades en placas de Petri estériles, conteniendo papel de filtro Whatman N° 1. El papel fue previamente humedecido con 4 ml de solución nutritiva Hoagland y las placas fueron incubadas durante 7 días en oscuridad a 30 °C en un fitotrón [luz:oscuridad (16:8); 70% humedad relativa (HR)].

### 2.9.3 Recolección de exudados radiculares de maíz

Las plántulas previamente obtenidas se transfirieron a Erlenmeyers estériles de 1 L de capacidad con 400 ml de solución de Hoagland y se colocó 10 plántulas en cada uno. Las plantas se cultivaron durante 14 días con condiciones ambientales reguladas, en fitotrón (luz:oscuridad (16:8); 70% HR). Cada 3 días, se recolectó la solución nutritiva de cada Erlenmeyer en botellas plásticas, se conservó -4 °C (fuente de exudados radiculares) y se reemplazó por un mismo volumen de solución de Hoagland fresca. Al finalizar el período de cultivo, se recuperaron las plantas y pesaron en balanza analítica.

La solución obtenida en grandes volúmenes por cada Erlenmeyer y conservada a -4 °C, se liofilizó, pesó, solubilizó en agua destilada y esterilizó por filtración (0,22 µm). Se realizó una prueba de esterilidad sembrando 100 µl de exudados radiculares (ERs) en medio de cultivo agarizado.

### 2.9.4 Caracterización parcial de los exudados radiculares de maíz

- **Determinación de proteínas:** La concentración de proteínas totales se determinó según el método de Bradford (1976). A 10 µl de muestra de ERs se agregaron 200 µl del reactivo Coomassie Blue G-250. La reacción se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 595 nm. Se realizó una curva patrón empleando Seroalbúmina bovina (BSA, según sus siglas en inglés) como estándar.

**-Determinación de carbono orgánico total:** La determinación de carbono orgánico total (COT) se realizó por diferencia entre las cuantificaciones de carbono total y carbono inorgánico. Se utilizó un analizador de carbono Shimadzu® TOC-L CPN, según las instrucciones del fabricante. El análisis se realizó en las instalaciones del INTI (Buenos Aires) como servicio a terceros.

**-Determinación de propiedades emulsificantes:** En tubos de hemólisis, se homogeneizó 1 ml de ERs con igual volumen de kerosene. A continuación, se determinó la altura de la columna líquida (mm) utilizando una escala milimetrada. La mezcla se agitó vigorosamente durante 2 minutos en agitador mecánico y se incubó en reposo a temperatura ambiente, durante 24 hs.

Transcurrido el tiempo mencionado, se determinó el índice de emulsificación (IE) (Cooper y Goldenberg, 1987), midiendo la altura de la emulsión formada (mm), dividida en la altura total de la columna líquida obtenida antes de la agitación. El valor obtenido se expresó en porcentaje (%).

### 2.10 Bioensayos en medio líquido

#### 2.10.1 Selección de cepas resistentes a Cr(VI) y lindano

El ensayo se realizó en frascos de vidrio con 20 ml de MM suplementado con glucosa ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ; MM<sub>5</sub>). Los frascos se contaminaron con  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) y/o  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  de lindano. Posteriormente, se inocularon con  $100 \mu\text{l}$  de la suspensión de esporos de las cepas ( $10^9 \text{ UFC ml}^{-1}$ ) previamente seleccionadas. Los cultivos se incubaron en agitador rotatorio (200 rpm) durante 7 días a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se realizaron controles bióticos (MM<sub>5</sub> sin contaminar e inoculado) y abióticos (MM<sub>5</sub> contaminado y sin inocular).

Transcurrido el tiempo de cultivo, éstos se centrifugaron ( $9000 \times g$ , 10 minutos.,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a fin de separar las células del sobrenadante. Se retiró 1 ml de sobrenadante para determinar Cr(VI) residual y 5 ml para determinar lindano residual empleando las metodologías que se detallan en apartados posteriores. La biomasa microbiana se lavó dos veces con agua destilada estéril y colocó en cápsulas previamente taradas. Luego se secaron a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta peso constante y determinó el peso seco por diferencia de pesadas.

Las cepas que presentaron el mejor rendimiento en la eliminación de lindano y cromo se seleccionaron para evaluar el efecto de los ERs de maíz en la disipación de contaminantes.

### 2.10.2 Desempeño de las cepas en presencia de exudados radiculares de maíz

**Ensayo N° 1:** Se repitió el mismo procedimiento detallado en el **punto 2.10.1** con las siguientes modificaciones: para la preparación de MM se utilizó glucosa en una concentración de  $1 \text{ g L}^{-1}$  ( $\text{MM}_1$ ) (en lugar de  $5 \text{ g L}^{-1}$ ). Los frascos se contaminaron artificialmente con Cr(VI) ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ) y/o lindano ( $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ ) e inocularon con las cepas seleccionadas.

**Ensayo N° 2:** Se repitió el procedimiento utilizado en el Ensayo N° 1, pero se reemplazó  $1 \text{ g}$  de glucosa por ERs ( $0,4 \text{ gC L}^{-1}$ , equivalentes a la cantidad de carbono presente en  $1 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa).

**Ensayo N° 3:** Se repitió el mismo procedimiento detallado en el Ensayo N° 2, con la siguiente modificación: los medios de cultivo se contaminaron artificialmente con  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de lindano en lugar de  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ , y se mantuvo la concentración de Cr(VI) ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ).

## 2.11 Bioensayo en suelo

### 2.11.1 Preparación del suelo y de la arena

Se trabajó con un lote de suelo no contaminado, homogeneizado correctamente, el cual se recolectó de una zona recreativa de la ciudad de San Miguel de Tucumán, Argentina. Las muestras se tomaron entre 5-15 cm de profundidad y la caracterización fisicoquímica del suelo fue realizada por el Laboratorio de Suelos de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (**Tabla 2.5**).

**Tabla 2.5.** Caracterización fisicoquímica del suelo no contaminado.

Parámetros	Suelo no contaminado
pH <sup>1</sup>	6,75
Calcáreo	(-) 40-20%
Materia orgánica <sup>1</sup> , %	1,92
N total <sup>1</sup> , %	0,83
P biodisponible <sup>3</sup>	14 mg kg <sup>-1</sup>
Arcilla <sup>4</sup> , %	42,9
Limo <sup>4</sup> , %	40,8
Arena <sup>4</sup> , %	16,2
Textura <sup>6</sup>	Arcillo limoso

\*suelo en agua destilada 1:2,5

<sup>1</sup>Método Walkley-Black; <sup>2</sup>Método Kjeldahl; <sup>3</sup>Método Bray-Kurtz; <sup>4</sup>Análisis de la textura del suelo por hidrómetro: Método de Bouyoucos modificado (Bouyoucos, 1962; Bradstreet, 1954; Hanlon y Johnson, 1984; Walkley y Black, 1934).

A fin de acondicionar el suelo, se separaron las partículas macroscópicas indeseables, retirando los elementos mayores a 2 cm (ramas, hojas, rocas, etc.). Luego, el suelo se trituroó manualmente, distribuyó en bandejas plásticas con un espesor menor a 3 cm y colocó en estufa a 30 °C para lograr un secado uniforme. Posteriormente se tamizó el suelo para obtener muestras homogéneas, empleando para ello un tamiz de 2 mm.

En el bioensayo en suelo, también se trabajó con muestras de arena fina no contaminada. La misma se distribuyó en bandejas plásticas, con un espesor menor de 3 cm y se colocó en estufa a 30° C para lograr un secado uniforme. Posteriormente, las muestras se tamizaron empleando un tamiz de 2 mm.

### 2.11.2 Determinación de la capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA) es una propiedad hídrica del suelo que se utiliza para estimar la disponibilidad de agua para las plantas. Para determinar la CRA del sistema suelo-arena, en frascos de vidrio de 1 L de capacidad se pesaron 100 g de suelo y 100 g de arena y se agitó manualmente de manera vigorosa para su homogenización. A continuación, se introdujo papel de filtro cortado en forma circular en un embudo de filtración colocado sobre un vaso de precipitación. La mezcla suelo-arena obtenida, se colocó dentro del embudo de filtración, se vertió 200 ml de agua corriente, se dejó filtrar y se recogió el agua filtrada, repitiendo el mismo paso dos veces. Finalmente el volumen de agua recuperada, que no fue retenida por el sistema se midió en probeta. Los ml de agua retenida por los 200 g del sistema suelo-arena corresponden al volumen necesario para alcanzar el 100 % de la capacidad de retención de agua por dicho sistema.

### 2.11.3 Determinación de la estabilidad de Cr(VI) y lindano en suelo

Con el objetivo de determinar el tiempo en el cual se estabilizan las interacciones fisicoquímicas entre el suelo y los contaminantes se realizó una curva de estabilidad para Cr(VI) y lindano.

Se trabajó con 200 g de sistema suelo-arena, conformado en partes iguales por cada componente, contaminado con  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cr(VI) y/o  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de lindano. A fin de asegurar una distribución uniforme de los contaminantes en el sistema, se pesaron 100 g de arena en frascos de vidrio de 1 L de capacidad, y se adicionó un volumen de solución de Cr(VI) y/o lindano necesario para alcanzar la concentración del metal y el plaguicida previamente mencionada. Se dejó evaporar en campana y a continuación se agregaron 100 g de suelo. Los frascos fueron cerrados y se mezcló manualmente de manera vigorosa el sistema para asegurar su homogeneización. Finalmente, se distribuyó 200 g del sistema suelo-arena en macetas plásticas.

La humedad del sistema se ajustó al 100 % de su CRA.

Las macetas se colocaron en una cámara de crecimiento durante 28 días, a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para la estabilización de los contaminantes en el suelo. Se tomaron muestras del sistema contaminado por triplicado cada 7 días para la determinación de Cr(VI) biodisponible

[Cr(VI)<sub>B</sub>] y lindano residual, empleando la metodología detallada en apartados posteriores.

### **2.11.4 Evaluación de la remoción de Cr(VI) y/o lindano por el sistema planta-microorganismo**

Con la finalidad de evaluar la remoción de Cr(VI) y/o lindano por el sistema planta-microorganismo, se contaminaron 200 g de un sistema suelo-arena con 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cr(VI) y/o 2 mg kg<sup>-1</sup> de lindano como se detalló en el **punto 2.11.4**. A continuación, se dejaron estabilizar los contaminantes en el suelo durante 14 días (tiempo previamente determinado). Paralelamente se germinaron semillas de maíz en vasos de telgopor con 15 g de suelo, durante 7 días, con condiciones ambientales reguladas en un fitotrón (luz:oscuridad (16:8); 30%HR).

Las plántulas obtenidas se trasplantaron a las macetas con el sistema contaminado estabilizado. Este momento se consideró tiempo cero (T<sub>0</sub>) del ensayo. Posteriormente en las raíces se inoculó 2 g L<sup>-1</sup> de la suspensión de biomasa de células vegetativas con la cepa seleccionada.

Las macetas fueron incubadas durante 14 días (30 °C, luz/oscuridad (16:8), 70% HR). Se trabajó por sextuplicado, con el siguiente diseño factorial (**Tabla 2.6**):

**Tabla 2.6.** Diseño factorial.

Condiciones	Planta	Microorganismo (Mo)	Lindano (Lin)	Cr(VI) (Cr)
1	No	No	No	No
2	Sí	No	No	No
3	No	Sí	No	No
4	Sí	Sí	No	No
5	No	No	Sí	No
6	Sí	No	Sí	No
7	No	Sí	Sí	No
8	Sí	Sí	Sí	No
9	No	No	No	Sí
10	Sí	No	No	Sí
11	No	Sí	No	Sí
12	Sí	Sí	No	Sí
13	No	No	Sí	Sí
14	Sí	No	Sí	Sí
15	No	Sí	Sí	Sí
16	Sí	Sí	Sí	Sí

El riego del suelo se realizó por capilaridad. Se colocó debajo de las macetas un plato de vidrio conteniendo agua corriente.

Luego de 14 días de tratamiento las plantas se cosecharon, lavaron cuidadosamente con abundante agua destilada, a fin de eliminar restos de suelo adherido a la superficie de los tejidos y secaron con papel adsorbente. Posteriormente, el 50 % de plantas de cada tratamiento se conservó a -4 °C para mantener el tejido fresco, mientras que el otro 50 % se secaron en estufa a 30 °C hasta peso constante.

Se determinó contenido de cromo tisular en parte aérea y raíces de las plantas.

Se tomaron muestras del sistema suelo-arena con la finalidad de determinar las concentraciones de Cr(VI)<sub>B</sub> y lindano residual empleando las metodologías que se detallan en apartados posteriores.

### 2.11.5 Evaluación del crecimiento vegetal

Para evaluar el efecto del Cr(VI) y lindano sobre el crecimiento de las plantas se determinaron diferentes parámetros: peso fresco (PS), peso seco (PF), número y longitud de hojas. Se cuantificó el número de hojas de coloración verde homogénea y hojas de coloración verde con tonalidades amarillentas o amarronadas (Prado y col., 2010). Se midió la longitud de las hojas y expresó en cm. El material vegetal se pesó en balanza analítica, discriminando en parte aérea y raíces y se expresó en g de PF. El material vegetal se secó en estufa a 30 °C hasta peso constante (~120 hs), se enfrió en desecador de vidrio y se pesó en balanza analítica. Los resultados se expresaron en g de PS.

### 2.11.6 Evaluación de estrés oxidativo en las plantas

Se trabajó con las raíces frescas provenientes del 50% de las plantas de cada tratamiento y se realizaron las siguientes determinaciones:

**-Contenido de malondialdehído:** La cuantificación de malondialdehído (MDA), un indicador de la peroxidación lipídica, se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Du y Bramlage (1992). Para la extracción del MDA, 1 g de tejido fresco se pesó, colocó en un mortero de porcelana y homogeneizó con 3 ml de ácido tricloroacético 0,1 %. El homogeneizado se centrifugó a 12000  $x$  g durante 5 minutos a fin de eliminar las proteínas precipitadas por el ácido. Para la determinación del MDA, 1 ml del sobrenadante se hizo reaccionar con 1 ml del reactivo ácido tiobarbitúrico (0,5 g en 100 ml de ácido tricloroacético 20%) calentando a 90 °C en un baño maría durante 20 minutos. Después de enfriar los tubos en hielo se centrifugó a 12000  $x$  g durante 10 minutos, recogió el sobrenadante y determinó la absorbancia a mismo a 440, 532 y 600 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Hitachi U-2800A, Japan). El contenido de MDA se calculó usando el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ )  $1,57 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Los resultados obtenidos se expresaron en equivalentes (Eq) de MDA producidos por gramo de tejido fresco (Eq MDA  $\text{g}^{-1}$  PF).



**-Cuantificación de la actividad superóxido dismutasa:** La determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Giannopolitis y Ries (1977) con algunas modificaciones. Se pesó 1 g de tejido fresco y se colocó en un mortero de porcelana frío. Se homogeneizó con 3 ml de buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 6 adicionado con 0,1 mM de EDTA. El extracto resultante se centrifugó a  $12000 \times g$  durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante para ser usado como fuente de enzima. La actividad SOD se midió siguiendo la fotoreducción del azul de nitrotetrazolio (NBT, por sus siglas en inglés) a formazan que se sigue por espectrofotometría a 560 nm, cuya formación resulta inversamente proporcional a la actividad SOD presente en la muestra (Beauchamp y Fridovich, 1971). A la mezcla de reacción (2 ml) conteniendo buffer fosfato de sodio 50 mM, (pH 7), metionina 9,9 mM, NBT 57  $\mu\text{M}$ , EDTA 0,1 mM y 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante se agregó 1,33  $\mu\text{M}$  de riboflavina justo antes de iniciar la reacción. Después de agregar la riboflavina los tubos se colocaron debajo de una lámpara fluorescente de 40 W a 25 °C durante 60 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, los tubos fueron removidos de la fuente luminosa y se procedió a leer la absorbancia del formazán a 560 nm contra un blanco de reactivos sin sobrenadante. Para eliminar la posible presencia de una actividad SOD endógena se incubó una mezcla de reacción sin riboflavina. En los resultados la actividad SOD se expresó como ( $\text{U mg proteína}^{-1}$ ).

**-Determinación de proteínas:** Para la extracción de proteínas del tejido vegetal se pesó 1 g de tejido fresco y se colocó en un mortero de porcelana frío donde se homogeneizó con 3 ml de buffer fosfato de sodio 50 mM, (pH 6). El homogeneizado se centrifugó a  $12000 \times g$  durante 15 minutos a fin de obtener un extracto (sobrenadante) límpido que se usó para cuantificar el contenido de proteínas según el método de Bradford (1976) previamente descrito en el **punto 2.9.4**.

### 2.12 Determinación analítica de los contaminantes en las diferentes matrices

#### 2.12.1 Determinación de metales pesados en los suelos fuente de aislamientos microbianos

Para determinar el contenido de metales pesados en las muestras de suelo recolectadas en la localidad de Argentina, se llevó a cabo una digestión de microondas de acuerdo al método descrito por Na Liu y col. (2013). Aproximadamente 300 mg de muestra de suelo se colocó en tubos de teflón de 50 ml y mezcló con 3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las mezclas se sellaron y dejaron toda la noche para su oxidación. Al segundo día, se agregó HNO<sub>3</sub> 65 %. Se empleó un sistema comercial de digestión por microondas Anton Paar Multiwave 3000 (Anton Paar GmbH, Graz, Austria), que incluía un horno de microondas con un rotor de 48 recipientes, con un sensor combinado de temperatura y presión. Los tubos se sometieron a radiación de microondas durante 5,5 minutos para llegar a 180 °C, alcanzando una presión máxima de 16 atm durante 4,5 minutos de digestión a temperatura y presión constantes. Después de enfriar a temperatura ambiente, todos los tubos se abrieron lentamente en campana extractora y se agregó un volumen de 50 µL de fluoruro de hidrógeno (HF) al 40 % para solubilizar el complejo de silicio. Luego las soluciones digeridas se filtraron, transfirieron a matraces de vidrio y diluyeron hasta un volumen final de 50 ml.

El contenido de metales pesados en las muestras de suelo se determinó mediante Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS), usando un instrumento de ICP-MS cuadrupolo ELAN DRC-e (Perkin Elmer SCIEX, Thornhill, Canadá). Se empleó un nebulizador PFAST de perfluoracetato (PFA) de alto rendimiento y resistente a HF acoplado a una cámara de pulverización ciclónica de cuarzo con el deflector interno y las líneas de drenaje enfriadas con el sistema PC3 de ESI (Omaha, NE, EE. UU.). Este análisis se realizó como parte de un servicio de terceros.

### 2.12.2 Determinación de la concentración de cromo en bioensayos y muestras vegetales

#### 2.12.2.1 Cuantificación de Cr(VI) en medio de cultivo líquido

La concentración de Cr(VI) se determinó colorimétricamente por reacción con 1,5-difenilcarbazida (DFC) en solución ácida (US EPA, 1994). Se tomó 50  $\mu\text{L}$  de muestra, se colocó en pocillo de microplaca y se agregó 50  $\mu\text{L}$  de DFC (5  $\text{mg L}^{-1}$ ). Finalmente, se logró el desarrollo del color acidificando el medio con 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 mM (pH 1). Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ GO (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 540 nm. Los valores obtenidos se compararon con una curva patrón y las lecturas de absorbancia de las muestras fueron corregidas restando la absorbancia de un blanco de reactivo, el cual fue preparado con el mismo método utilizando 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada en lugar de la muestra.

#### 2.12.2.2 Cuantificación de Cr(VI) biodisponible en muestras del sistema suelo-arena

Se utilizó el método desarrollado por Csillag y col. (1999), el cual permite medir la fracción biodisponible del Cr(VI) a partir de muestras de suelo, ya que imita la succión máxima de una planta (potencial de agua en el suelo, pF) = 4,2).

Se emplearon tubos de centrifuga de 250 ml provistos de filtros de teflón, los cuales facilitaron el proceso de percolado y recuperación de la fase líquida del suelo. En el interior de los tubos de centrifuga se colocó tela voile en forma de saco y se la sujetó con bandas elásticas. Posteriormente se pesaron 50 g de muestras de los sistema, se colocaron en los dispositivos y centrifugaron a  $5050 \times g$  durante 1 hs. La fracción recuperada corresponde exclusivamente al estado hexavalente del Cr (Polti y col., 2011), el cual se encuentra disuelto, correspondiente a la fracción que estaría inmediatamente disponible para las plantas. Finalmente, la concentración de  $\text{Cr(VI)}_B$  en la fase acuosa se determinó colorimétricamente por reacción con 1,5-difenilcarbazida (DFC) en solución ácida (US EPA, 1994).

### 2.12.3 Cuantificación de cromo tisular

Para cuantificar el Cr total en los tejidos vegetales, se realizó una digestión de microondas de acuerdo al método establecido por Na Liu y col. (2013) descrito en el **punto 2.12.1**. Para llevar a cabo este procedimiento, las plantas se secaron previamente en estufa a 30 °C hasta peso constante (~120 hs) y después de enfriar en desecador de vidrio, se molieron en un mortero hasta polvo fino, discriminando en parte aérea y raíces.

Luego de la digestión, los extractos vegetales obtenidos se ajustaron a una acidez 0,1 N, y finalmente el contenido de cromo recuperado se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin-Elmer 373, England). Los valores obtenidos se compararon con una curva patrón. En los resultados la concentración tisular de cromo se expresó en  $\text{mg g}^{-1}$  PS.

### 2.12.4 Determinación de plaguicidas organoclorados en los suelos fuente de aislamientos microbianos y muestras del sistema suelo-arena

Para determinar el contenido de plaguicidas en las muestras de suelo recolectadas en la localidad de Argentina, se tomaron muestras de 5 g de suelo y colocaron en tubos de centrífuga de 50 ml. Se agregaron 4 ml de agua destilada de calidad cromatográfica, 1 ml de metanol (grado plaguicida) y 5 ml de n-hexano (grado plaguicida). Se agitó vigorosamente durante 10 minutos para favorecer el traspaso del lindano desde la fase acuosa a la fase orgánica. Posteriormente se centrifugó a  $8385 \times g$  durante 10 minutos y se colocó en freezer a -15 °C durante 10 minutos para favorecer la separación de fases. De esta forma, se obtuvieron 3 fases completamente separadas: suelo, fase acuosa, fase orgánica. Esta última, que se encontraba en la parte superior del recipiente debido a su baja densidad, fue retirada cuidadosamente, recuperándose en todos los casos un volumen final de 4 ml (en donde se encontraba el plaguicida residual) el cual fue colocado en tubos de hemólisis. Con el fin de concentrar las muestras tomadas, se dejó evaporar a sequedad, se resuspendió en 1 ml de n-hexano y finalmente se colocó en un vial con cierre hermético y septo de teflón para su posterior inyección en un Cromatógrafo de Gases con Detector de Microcaptura de Electrones (GC/ $\mu$ ECD) (Agilent 7890A), equipado con columna capilar HP5 (30 mx 0,53 mm x 0,35 m), un inyector Agilent 7693B dividido / sin división y software Agilent ChemStation. Las condiciones cromatográficas fueron las

siguientes: temperatura de entrada: 250 °C, caudal de gas portador (nitrógeno): 25 cm s<sup>-1</sup>, temperatura inicial del horno: 180 °C aumentando a 250 °C a 40 °C minuto<sup>-1</sup> y aumentando a 280 °C a 10 °C minuto<sup>-1</sup>. La temperatura del detector fue de 320 °C y el volumen de inyección fue de 1 ml. La cuantificación de/los plaguicidas se realizó utilizando una curva de calibración con diluciones apropiadas de patrones de calibración del correspondiente plaguicida (AccuStandard, New Haven, EE. UU.).

### 2.12.5 Extracción y determinación de lindano en medio de cultivo líquido

Se colocaron en tubos de vidrio 5 ml de las muestra procedentes de los bioensayos en medio de cultivo líquido y se agregó 15 ml de n-hexano. Las mezclas se sonicaron durante 30 minutos. Luego se retiró un volumen apropiado de la fase orgánica y se colocó en tubos de hemólisis a los que se agregaron 0,5 g de NaSO<sub>4</sub> para deshidratar las muestras. Finalmente, se colocó 1 ml del extracto obtenido en un vial para su posterior inyección en un GC/μECD.

### 2.13 Ensayo de ecotoxicidad

Para evaluar la disminución en la concentración de Cr(VI) y lindano en los diferentes tratamientos biológicos, se realizó un bioensayo de toxicidad empleando semillas de *Lactuca sativa* (lechuga), como indicador. Se sembraron 30 semillas de lechuga en placas de Petri que contenían 15 g de las muestras de los sistemas tratados biológicamente y previamente ajustados a una humedad del 40%. Las placas se incubaron en oscuridad, durante 5 días a 25 °C y 70% HR. Al finalizar el período de incubación, se determinaron las longitudes de la radícula e hipocótilo de las plántulas, empleando una escala milimetrada

Además, previo a la implementación de la prueba, se verificó que el lote de semillas tuviera un porcentaje de germinación superior al 90% y una baja variabilidad de la elongación de las radículas e hipocótilos.

### 2.14 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de datos se empleó el software Infostat (versión libre: 2017, Argentina). Los datos fueron sujetos a análisis de la varianza de una vía (ANOVA), considerándose significativo un nivel de probabilidad de  $p < 0,05$ . Con el fin de identificar diferencias significativas entre condiciones, se realizó un test de Fisher ( $p < 0,05$ ).

Para el caso particular del bioensayo en suelo, el diseño factorial fue realizado empleando el software estadístico Minitab (versión: Minitab® 17.2.1, Estados Unidos).

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Análisis de plaguicidas organoclorados y metales pesados en muestras de suelo

La presencia de plaguicidas organoclorados y metales pesados se determinó en muestras de suelo colectadas en la localidad de Argentina (Santiago del Estero, Argentina) donde se encontró a principio de los '90 un depósito ilegal de plaguicidas. Aunque hace más de 10 años el depósito fue removido por excavación, los análisis cromatográficos de las muestras de suelo actuales demostraron la presencia de tóxicos orgánicos. Entre los POs encontrados se detectó lindano en concentraciones superiores a las permitidas por la Ley Federal de Residuos Peligrosos N° 24051 (concentración permitida  $0,01 \mu\text{g g}^{-1}$  de lindano), a pesar de que en nuestro país el uso del plaguicida está prohibido o restringido desde hace más de 20 años (**Tabla 3.1**). Si bien el  $\gamma$  - HCH fue el plaguicida dominante, se identificaron en las muestras de suelo otros POs tales como aldrin, clordano, diclorodifeniltricloroetano, metoxicloro, entre otros. Sin embargo, estos contaminantes orgánicos pertenecientes al grupo de compuestos clorados alifáticos y compuestos clorobencenos se presentaron en concentraciones menores a las permitidas según los niveles guía. La presencia de estos compuestos en las muestras de suelo analizadas puede explicarse en virtud de la alta hidrofobicidad de los mismos, lo que ocasiona que se unan fuertemente a la materia orgánica del suelo. De aquí, la elevada persistencia y resistencia a la biodegradación de los POs.

Los análisis de las muestras de suelo revelaron también la presencia de metales pesados y metaloides (**Tabla 3.2**). La concentración de Cr total detectada fue inferior al nivel permitido según la Ley Federal de Residuos Peligrosos N° 24051 ( $250 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Sin embargo, se detectaron otros metales pesados tales como Ba, Co, Ni, Cu, Cd, Zn, Hg, en las muestras analizadas. Estos compuestos son altamente peligrosos para la salud, afectan el crecimiento vegetal, e impactan negativamente en la microflora del suelo (Garbisu y Alkorta, 2001; McGrath y col., 2001).

Según datos de la Agencia de Protección Ambiental, en el 40% de los sitios contaminados con desechos peligrosos se presentan tanto compuestos orgánicos e inorgánicos (Olaniran y col., 2013). Además, varios autores detectaron contaminación mixta no solo en zonas rurales e industriales expuestas directamente a la acción antrópica, sino también en áreas remotas debido a los fenómenos de difusión de estos contaminantes (Álvarez y col., 2017).



**Tabla 3.1.** Plaguicidas organoclorados detectados en los suelos (fuente de muestras biológicas) y niveles guía de calidad de suelo.

Plaguicidas organoclorados	Concentraciones detectadas ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )				Niveles guía ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )(*)
	Muestra A	Muestra B	Muestra C	Promedio $\pm$ desvío estándar	
$\gamma$ - HCH(**)	0,263	0,0002	0,0003	0,088 $\pm$ 0,124	0,01
<b>Compuestos alifáticos clorados</b>					5
<b>Heptacloro</b>	0,0062	0,0031	0,0017	0,004 $\pm$ 0,002	
<b>Aldrín</b>	0,0214	0,0015	0,0001	0,008 $\pm$ 0,010	
<b>Heptacloro epóxido A</b>	0,0155	ND	ND	0,015 $\pm$ 0,000	
<b>Heptacloro epóxido B</b>	0,0044	0,0013	ND	0,003 $\pm$ 0,002	
<b>Compuestos clorobencenos</b>					2
<b>DDE(**)</b>	0,0010	0,0008	0,0027	0,002 $\pm$ 0,001	
<b>Clordano</b>	0,0371	0,0009	ND	0,019 $\pm$ 0,018	
<b>DDD(**)</b>	0,0096	ND	0,0013	0,005 $\pm$ 0,004	
<b>DDT(**)</b>	0,0052	ND	ND	0,005 $\pm$ 0,000	
<b>Metoxicloro</b>	0,0193	ND	ND	0,019 $\pm$ 0,000	

(\*) Niveles permitidos por la Ley Federal de Residuos Peligrosos N° 24051.

(\*\*)  $\gamma$ - HCH:  $\gamma$ -hexaclorociclohexano (lindano); DDE: diclorodifenildicloroetileno; DDD: diclorodifenildicloroetano; DDT: diclorodifeniltricloroetano.

**Tabla 3.2.** Metales pesados y metaloides detectados en los suelos (fuente de muestras biológicas) y niveles guía de calidad de suelo.

Metales pesados y metaloides	Concentraciones detectadas ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )				Niveles guía ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )(*)
	Muestra A	Muestra B	Muestra C	Promedio $\pm$ desvío estandar	
<b>Mg</b>	33	42	53	43 $\pm$ 8	(**)
<b>Al</b>	607	674	1616	966 $\pm$ 460	(**)
<b>P</b>	84793	8440	4247	32493 $\pm$ 37021	(**)
<b>Mn</b>	698	684	735	705 $\pm$ 21	(**)
<b>Co</b>	11	11	10	10,7 $\pm$ 0,3	50
<b>Ni</b>	17	15	17	16 $\pm$ 1	100
<b>Cu</b>	34	27	31	31 $\pm$ 3	100
<b>Zn</b>	74	68	71	71 $\pm$ 3	500
<b>Sr</b>	192	180	125	166 $\pm$ 29	(**)
<b>Cd</b>	0,2	0,02	0,3	0,16 $\pm$ 0,10	5
<b>Ba</b>	580	466	302	449 $\pm$ 114	500
<b>Hg</b>	0,5	0,8	0,7	0,6 $\pm$ 0,1	2
<b>Ti</b>	10	5	7	7 $\pm$ 2	(**)
<b>Pb</b>	21	9	14	15 $\pm$ 5	500
<b>U</b>	3	3	4	3,5 $\pm$ 0,5	(**)
<b>V</b>	72	67	60	66 $\pm$ 5	(**)
<b>Cr</b>	<b>33</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>32 <math>\pm</math> 1</b>	<b>250</b>
<b>Fe</b>	28816	22303	20318	23579 $\pm$ 3308	(**)
<b>As</b>	8	8	6	7,6 $\pm$ 0,1	30
<b>Sn</b>	191	94	129	138 $\pm$ 40	50
<b>Ti</b>	7771	7775	6895	7480 $\pm$ 414	(**)

(\*) Niveles permitidos por la Ley Federal de Residuos Peligrosos N° 24051.

(\*\*) Compuesto no regulado por La Ley Federal de Residuos Peligrosos N° 24051.

### 3.2 Aislamiento de actinobacterias

Las actinobacterias se estudian con fines biotecnológicos desde hace más de 20 años. Se trata de un grupo de microorganismos con gran versatilidad fisiológica y metabólica debido a la producción de enzimas extracelulares y de una gran variedad de metabolitos secundarios, lo que les confiere propiedades relevantes para intervenir en procesos de biorremediación (Goodfellow y col., 2012). Dentro de la clase Actinobacteria, el género *Streptomyces* se destaca por su capacidad para desarrollarse en presencia de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Álvarez y col., 2017), además de ser la mayor fuente de metabolitos secundarios de interés biotecnológico que se conoce actualmente (Álvarez y col., 2017). El crecimiento filamentoso de los miembros del género y las sustancias extracelulares que producen, favorecen la colonización de los suelos que habitan por lo que en un hábitat sometido a constantes variaciones fisicoquímicas, la capacidad de esporulación del género *Streptomyces* representa una ventaja adicional para su supervivencia y propagación en el suelo (Ensign, 1978; Mayfield y col., 1972).

El empleo de microorganismos aislados desde sitios contaminados representa una ventaja en procesos de biorremediación, debido a que estarían adaptados a vivir en presencia de los contaminantes.

En el presente trabajo de Tesis se aislaron actinobacterias a partir de muestras de suelo libre de vegetación, rizósfera y plantas crecidas en zonas contaminadas de la localidad de Argentina (Santiago del Estero). De las 57 colonias obtenidas, 39 provenían de rizósfera, 14 colonias de suelo y 4 colonias de tejidos vegetales. Las características macroscópicas de los aislamientos permitieron identificarlos, en primera instancia, como actinobacterias del género *Streptomyces*. Los miembros del grupo presentan colonias con características diferenciales como ser la presencia de un micelio de sustrato y de un micelio aéreo, además de la producción de exopigmentos difusibles. La morfología típica de las colonias de aspecto duro y rugoso también se utilizó como criterio de identificación (Schrempf, 2006).

### 3.3 Evaluación cualitativa de la tolerancia microbiana a Cr (VI) y lindano

La presencia conjunta de contaminantes de diferente naturaleza química en un lugar determinado, es un problema difícil de abordar principalmente debido a los diferentes procesos que intervienen en la remoción de cada tipo de contaminante (Aparicio y col., 2015; Zhang y col., 2013). La probabilidad de encontrar cepas que desarrollen estrategias de tolerancia/supervivencia a contaminantes orgánicos e inorgánicos por medio de propiedades intrínsecas, podría resultar mayor en los aislamientos de sitios co-contaminados. Por ello, se realizaron ensayos cualitativos de tolerancia de los microorganismos aislados a Cr(VI) y lindano en MM<sub>10</sub> sólido. Este medio de cultivo está constituido por los nutrientes mínimos (sales y glucosa) indispensables para el crecimiento microbiano, en una composición química definida. La evaluación cualitativa de tolerancia a 250 mg L<sup>-1</sup> de Cr (VI) y/o 250 µg L<sup>-1</sup> de lindano, se llevó a cabo comparando el crecimiento microbiano a lo largo de la siembra microbiana por estriado en el MM<sub>10</sub> en ausencia y en presencia de uno o de ambos contaminantes.

Se seleccionaron los aislamientos que presentaron un crecimiento mayor a 2 cm (crecimiento abundante), similar al observado en el medio de cultivo sin contaminantes. La mayoría de las cepas presentaron baja tolerancia a los tóxicos, debido a que el crecimiento microbiano fue inferior a 1 cm a lo largo de la siembra por estriado.

En MM<sub>10</sub> contaminado con lindano, 20 aislamientos presentaron crecimiento abundante; sin embargo, solo 8 de ellos crecieron más de 2 cm en presencia de Cr(VI). Finalmente, 5 de estos aislamientos fueron capaces de crecer abundantemente en presencia de ambos tóxicos, por lo que se seleccionaron para llevar a cabo los ensayos posteriores. Los microorganismos se denominaron cepas Z2 y Z38 (aislados de rizosféra), ZF y ZI (aislados de suelo) y ZII (aislado de tejidos vegetales).

Las colonias seleccionadas tolerantes a la presencia conjunta de Cr(VI) y lindano correspondió al 9% del total de microorganismos aislados. Este porcentaje indicó que las muestras colectadas contenían un alto nivel de bacterias no tolerantes a la presencia de ambos contaminantes, al menos en las concentraciones utilizadas en este estudio. La baja tolerancia microbiana a la mezcla de contaminantes fue informada por otros autores. Por ejemplo, Tripathi y col. (2011) aislaron bacterias a partir de un efluente de curtiembre, informando

que de 42 aislamientos tolerantes a Cr(VI) o pentaclorofenol (PCP), solo una cepa de *Bacillus* sp. presentó tolerancia ambos contaminantes.

Es conveniente mencionar que las concentraciones de Cr(VI) y lindano usadas en este trabajo fueron seleccionadas de acuerdo a los resultados obtenidos por Polti y col. (2014). Los autores observaron que el crecimiento microbiano de actinobacterias en MM<sub>10</sub> sólido contaminado con 250 µg L<sup>-1</sup> de lindano y 500 mg kg<sup>-1</sup> de Cr(VI) resultaba inhibido. Debido a que el Cr(VI) en niveles tóxicos puede inhibir el metabolismo degradativo, en el presente trabajo de Tesis se decidió utilizar una concentración de Cr(VI) de 250 mg L<sup>-1</sup>. Las concentraciones utilizadas de ambos contaminantes fueron similares a las informadas en la bibliografía para sitios co- contaminados [en el orden de µg L<sup>-1</sup> (lindano) y mg L<sup>-1</sup> Cr (VI)] y resultan suficientes para producir toxicidad aguda en los organismos (Fuentes y col., 2011; Polti y col., 2011).

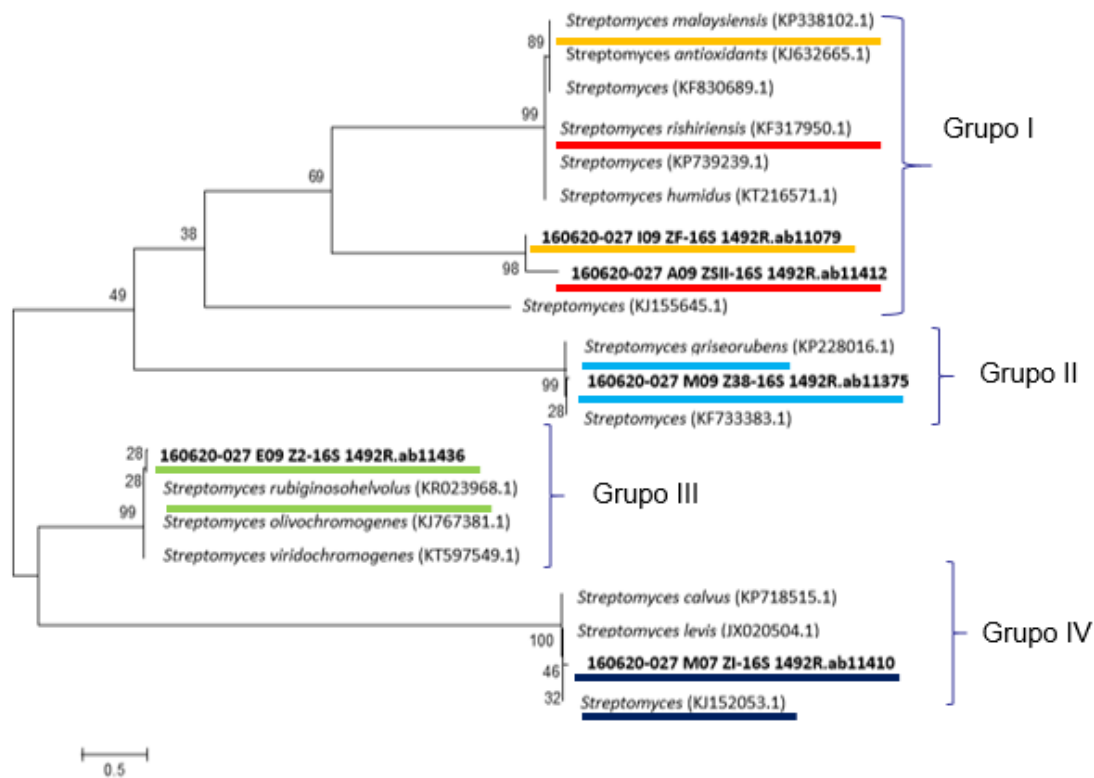
### 3.4 Identificación molecular de las cepas seleccionadas

Con el objetivo de confirmar la filiación taxonómica de las bacterias tolerantes a Cr(VI) y lindano, se determinaron las secuencias parciales del ADNr 16S de las cepas Z2, Z38, ZF, ZI y ZII. Se utilizaron las secuencias de aislamientos de colección más cercanas a las secuencias de las cepas estudiadas, para la posterior obtención de un árbol filogenético (**Figura 3.1**). Según esta comparación, en el Grupo I, las cepas ZF y ZII presentaron similitud con *Streptomyces malaysiensis* (95%) y *Streptomyces rishiriensis* (96%), respectivamente. Además, se determinó que la cepa Z38 estaba muy relacionada a *Streptomyces griseorubens* (96% de similitud) (Grupo II). Por su parte, la cepa Z2 y ZI, presentaron 96% de similitud con *Streptomyces rubiginosohelvolus* (Grupo III) y *Streptomyces* FXJ23y (Grupo IV), respectivamente. La identificación molecular confirmó que las 5 cepas aisladas pertenecían al género *Streptomyces*, ya que sus secuencias de ADNr 16S muestran una similitud mayor al 95% con los miembros de este grupo.

Varios trabajos realizados en nuestro laboratorio centraron sus esfuerzos en el aislamiento de actinobacterias con tolerancia a diferentes metales pesados (Albarracín y col., 2008; Amoroso y col., 1998, 2000, 2001; Polti y col., 2007; Siñeriz y col., 2009) y a plaguicidas organoclorados (Benimeli y col., 2007; Fuentes y col., 2010). Álvarez y col.

(2013), sugirieron que la adquisición de la resistencia a metales pesados en bacterias del género *Streptomyces* resultaría de un proceso dinámico, facilitado por un genoma lineal y una impresionante maquinaria metabólica. Estos autores señalan que la resistencia a metales pesados no se restringe a un solo linaje del género, sino que está ampliamente distribuida en toda la filogenia de *Streptomyces*, por lo que la resistencia a metales se habría originado varias veces y por diferentes mecanismos en la historia evolutiva del grupo.

La secuencia parcial de nucleótidos del gen ADNr 16S de las cepas Z2, Z38, ZF y ZII y ZI se depositaron en la base de datos del GenBank con los números de acceso KR023968, KP228016, KP338102, KJ152053 y KJ152053, respectivamente.



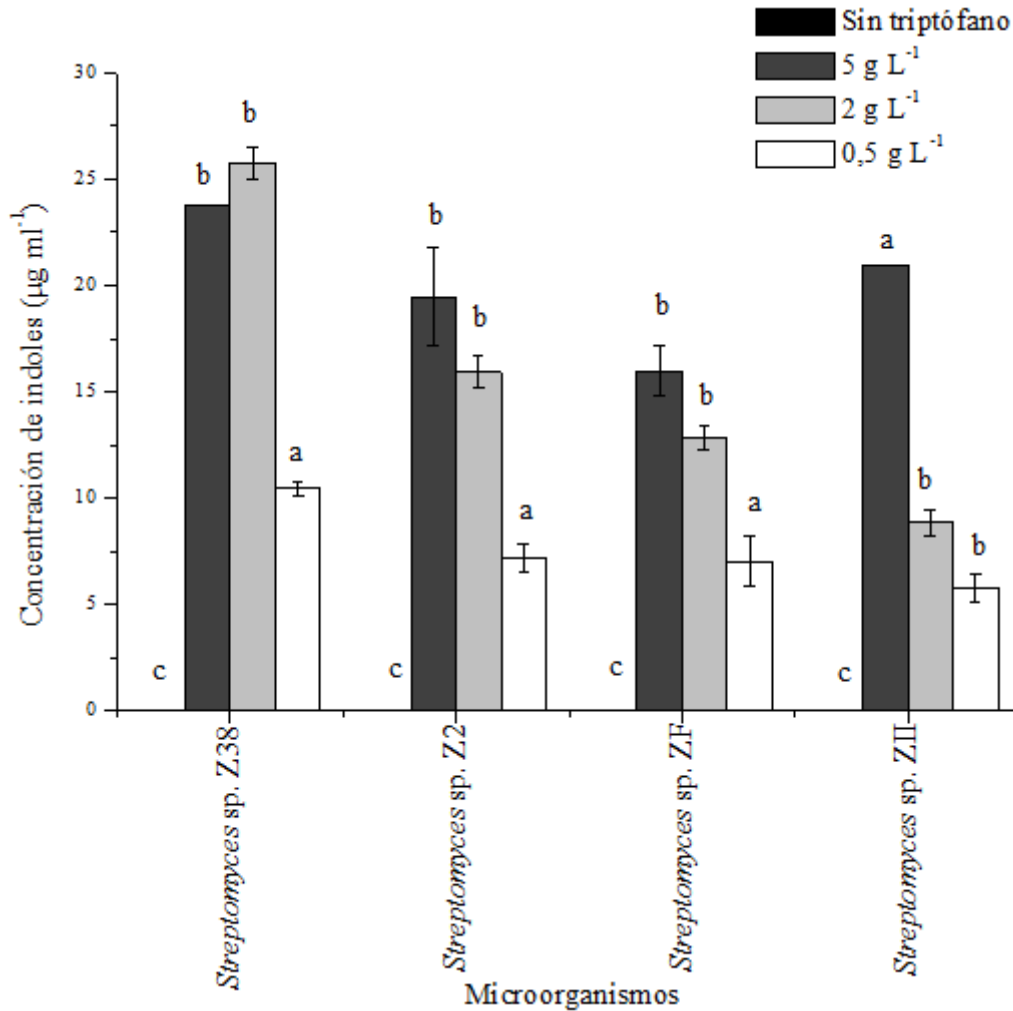
**Figura 3.1.** Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de las secuencias del ADNr 16S de cepas tolerantes a Cr(VI) y lindano.

### 3.5 Evaluación de propiedades promotoras del crecimiento vegetal en las cepas *Streptomyces*

Las interacciones entre las plantas y sus bacterias asociadas se estudian desde hace años por lo que se describieron efectos tanto beneficiosos como patogénicos para la especie vegetal huésped (Gnanamanickam, 2007). Las plantas pueden recibir beneficios de las bacterias mediante la mejora del crecimiento vegetal y la reducción del estrés cuando se desarrollan en lugares contaminados (Compant y col., 2010). Estas bacterias se conocen como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés).

De acuerdo con esto se evaluó si las cepas de *Streptomyces* sp. estudiadas presentaban alguna característica beneficiosa para las plantas. Dicha evaluación se llevó a cabo en cuatro de las bacterias seleccionadas (*Streptomyces* spp. Z38, Z2, ZF y ZII). *Streptomyces* sp. ZI no fue utilizada en ensayos posteriores por su escasa producción de esporas en los medios de cultivos utilizados.

*Streptomyces* sp. Z2 y *Streptomyces* sp. Z38 solubilizaron fosfato inorgánico debido a que se observó la formación de un halo de hidrólisis alrededor de las colonias. Se detectó actividad ACC desaminasa en las cepas de *Streptomyces* spp. Z2, Z38 y ZII. Las mismas fueron capaces de crecer usando ACC como única fuente de N<sub>2</sub>, y presentaron un crecimiento microbiano similar al medio control con L-asparagina. De modo contrario, *Streptomyces* sp. ZF fue incapaz de crecer en ausencia del aminoácido como fuente de nitrógeno. Otra característica evaluada fue la producción de AIA a partir de 0,5, 2 y 5 g L<sup>-1</sup> de triptófano como aminoácido precursor (**Figura 3.2**). La producción de indoles fue similar en las cuatro cepas estudiadas cuando se utilizaron 2 y 5 g L<sup>-1</sup> de triptófano. Sin embargo, cuando se utilizó 0,5 g L<sup>-1</sup> del precursor, la cantidad de auxina producida disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.2.** Concentración de indoles producidos por las cepas de *Streptomyces* sp. cultivadas en medio líquido suplementado con distintas concentraciones de triptófano (30° C, 5 días, oscuridad). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Control negativo: medio líquido sin triptófano.

Otra de las propiedades estudiadas fue la producción de sideróforos. De las cepas evaluadas, solo *Streptomyces* sp. Z38 fue capaz de producir siderofóros, ya que se observó la formación de un halo anaranjado alrededor de la colonia.

Varias investigaciones demostraron el efecto positivo de las bacterias con estas características sobre el crecimiento de plantas desarrolladas bajo condiciones de estrés (Hider y col., 2010; Siddikee y col., 2010). Las bacterias con la capacidad de solubilizar fosfato



gánico a través de la producción de compuestos quelantes o por modificación del pH tienen un gran impacto en la movilización de nutrientes esenciales para el crecimiento vegetal. Las bacterias productoras de sideróforos también facilitan la captura de  $\text{Fe}^{3+}$  desde el ambiente. Del mismo modo, pueden tener afinidad por otros elementos traza y formar complejos con metales tóxicos desempeñando un papel importante en su movilidad y biodisponibilidad (Hider y col., 2010). Dimka y col. (2009) encontraron que la cepa de *Streptomyces acidiscabies* resistente a níquel, producía sideroforos capaces de unirse a este metal. Estos autores también reportaron que el crecimiento de la planta *Vigna unguiculata* bajo condiciones de estrés y en presencia de *Streptomyces acidiscabies*, se vio favorecido por la solubilización y suministro de hierro a las plantas y disminución en la absorción de Ni.

Ciertas bacterias pueden reducir las presiones bióticas y abióticas a las que una planta puede estar sometida, mediante la regulación de fitohormonas. Khan y col. (2012) determinaron que la inoculación de la especie vegetal *Cucumis sativus* L. con el hongo *Paecilomyces formosus*, productor de AIA, favoreció el crecimiento de la planta huésped bajo condiciones de estrés salino. Este efecto benéfico se vio reflejado en un incremento de los valores de varios parámetros de crecimiento vegetal. El AIA producido por las bacterias y/o las plantas estimula la proliferación de las células vegetales promoviendo su elongación.

Las plantas expuestas a diversos tipos de estrés muestran un aumento en los niveles de etileno, lo que daña al vegetal. La producción de la enzima ACC desaminasa por las bacterias forma parte de un mecanismo que regula la síntesis de la hormona etileno, manteniéndola a niveles bajos (Hamedi y col., 2014). Así, las plantas que crecen en asociación con PGPB podrían ser más resistentes a la inhibición del crecimiento vegetal (Glick y col., 2007).

Cada uno de los compuestos microbianos mencionados como promotores del crecimiento vegetal puede intervenir en diferentes momentos del ciclo de vida de una planta. Por este motivo, para lograr un efecto positivo en el desarrollo vegetal, la inoculación con bacterias que posean una única característica no sería suficiente (Taj y Rajkumar, 2016). Por este motivo, resulta de interés contar con microorganismos que tengan capacidad de producir diferentes moléculas promotoras del crecimiento vegetal, considerando el posible efecto acumulativo de las mismas, como es el caso de las cepas de *Streptomyces* sp. Z2 y *Streptomyces* sp Z38 (**Tabla 3.3**).

**Tabla 3.3.** Características promotoras de crecimiento vegetal en las cepas seleccionadas.

Microorganismos	Producción de sideróforos	Solubilización de fosfato inorgánico	Producción de AIA*	Actividad ACC desaminasa**
<i>Streptomyces sp. Z2</i>	+	-	+	+
<i>Streptomyces sp. Z38</i>	+	+	+	+
<i>Streptomyces sp. ZF</i>	-	-	+	-
<i>Streptomyces sp. ZII</i>	-	-	+	+

\*AIA: Ácido indolacético; \*\*ACC: ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico.

### 3.6 Bioensayos en medio de cultivo líquido

#### 3.6.1 Evaluación cuantitativa de la remoción de Cr(VI) y lindano por cepas de *Streptomyces sp.*

Para ser empleadas en procesos de biorremediación, resulta necesario contar con cepas bacterianas que además de desarrollar estrategias de supervivencia en presencia de los tóxicos, contribuyan a la remoción de los mismos.

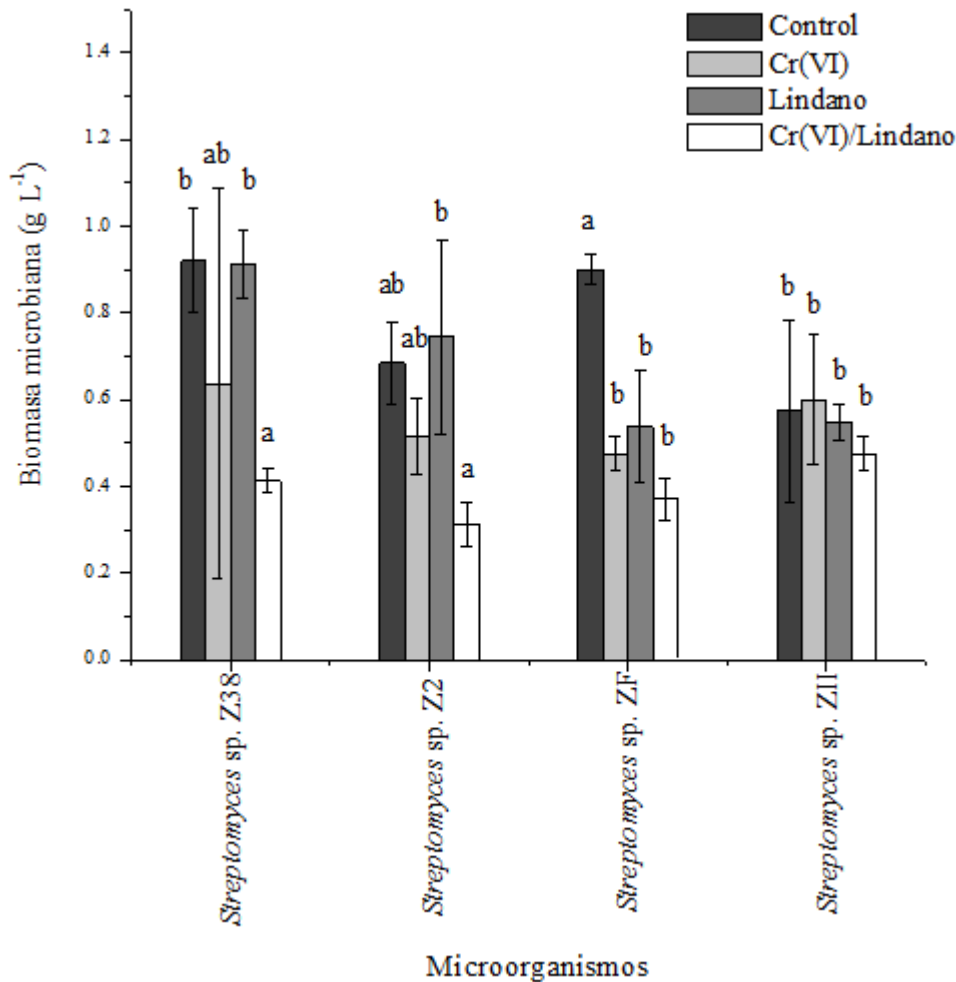
En este sentido, se evaluó el crecimiento y la remoción de Cr(VI) y lindano por las cepas de *Streptomyces sp.* estudiadas en MM líquido suplementado con 5 g L<sup>-1</sup> de glucosa. Los medios de cultivo fueron contaminados con 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y/o 0,25 mg L<sup>-1</sup> de lindano.

### 3.6.1.1 Determinación del crecimiento microbiano

Previamente se realizó una evaluación rápida y cualitativa del crecimiento microbiano en MM<sub>10</sub> sólido co-contaminado (**Punto 3.2**). Sin embargo, con el objetivo de evaluar cuantitativamente la influencia de los contaminantes sobre el crecimiento de las cepas, se evaluó la biomasa microbiana determinando el peso seco (PS) de las bacterias en medio de cultivo líquido (MM<sub>5</sub>).

Todos los microorganismos pudieron crecer en presencia de Cr(VI) o lindano, y los valores de biomasa alcanzados no fueron significativamente diferentes a los controles ( $p > 0,05$ ). La mayor biomasa fue alcanzada por *Streptomyces* sp. Z38, con un valor de  $0,63 \pm 0,45 \text{ g L}^{-1}$  en presencia de Cr(VI) y  $0,91 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$  en presencia de lindano (**Figura 3.3**).

En los medios de cultivo co-contaminados el crecimiento microbiano de *Streptomyces* spp. Z2, Z38 y ZF disminuyó con respecto a los medios de cultivo contaminados con Cr(VI) o lindano ( $p < 0,05$ ). La presencia de contaminantes orgánicos y/o inorgánicos favorece la producción de especies reactivas del oxígeno en las células. En general, las bacterias sintetizan proteínas implicadas en la respuesta al estrés oxidativo (Gastaldo y col., 2007). Estos mecanismos de defensa requieren de energía, lo que podría reflejarse en una disminución del crecimiento celular.

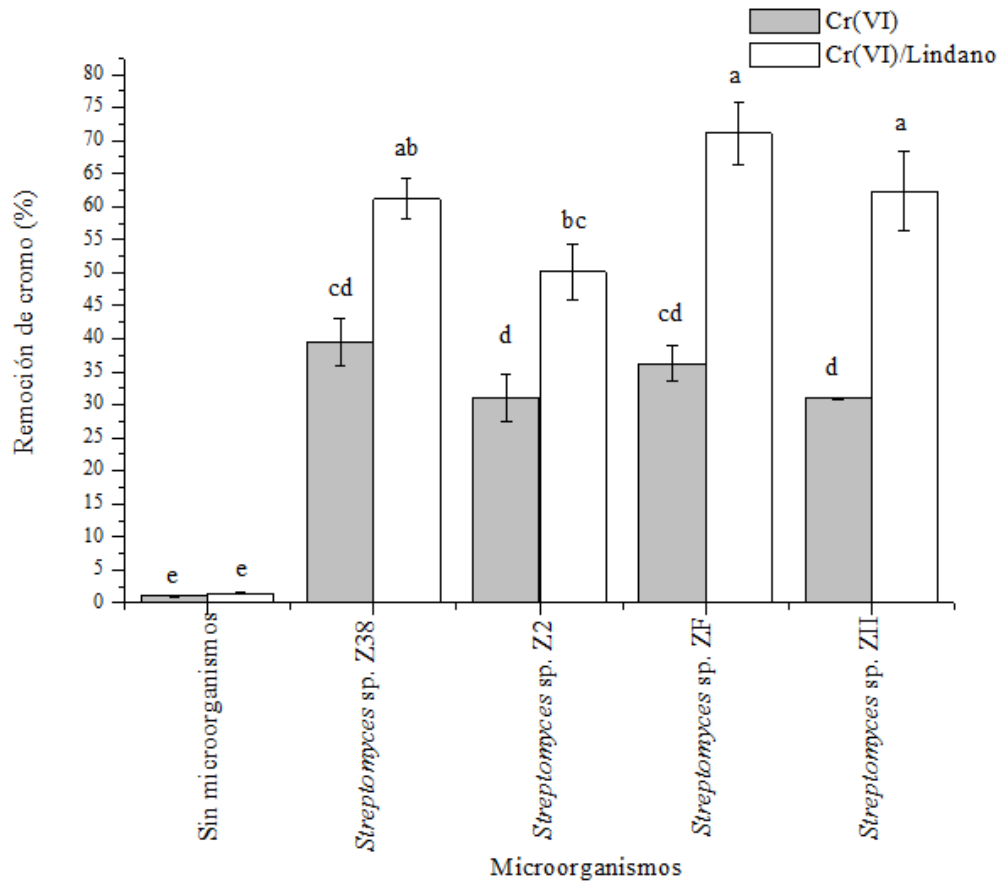


**Figura 3.3.** Biomasa microbiana de las cepas de *Streptomyces* sp. cultivadas en medio mínimo suplementado con 5 g L<sup>-1</sup> de glucosa y contaminado con 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y/o 0,25 mg L<sup>-1</sup> de lindano (30° C, 7 días, 200 rpm). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones, para cada cepa estudiada ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Control: sin contaminantes. Cr(VI); Lindano: medio contaminado. Cr(VI)/Lindano: medio co-contaminado.

### 3.6.1.2 Evaluación de la remoción de Cr(VI) y lindano

En presencia de Cr(VI) como único contaminante, la mayor remoción se obtuvo con *Streptomyces* sp. Z38 (40%) (**Figura 3.4**). En cambio, en el sistema co-contaminado la máxima remoción de Cr(VI) se alcanzó en presencia de *Streptomyces* sp. ZF (70%).

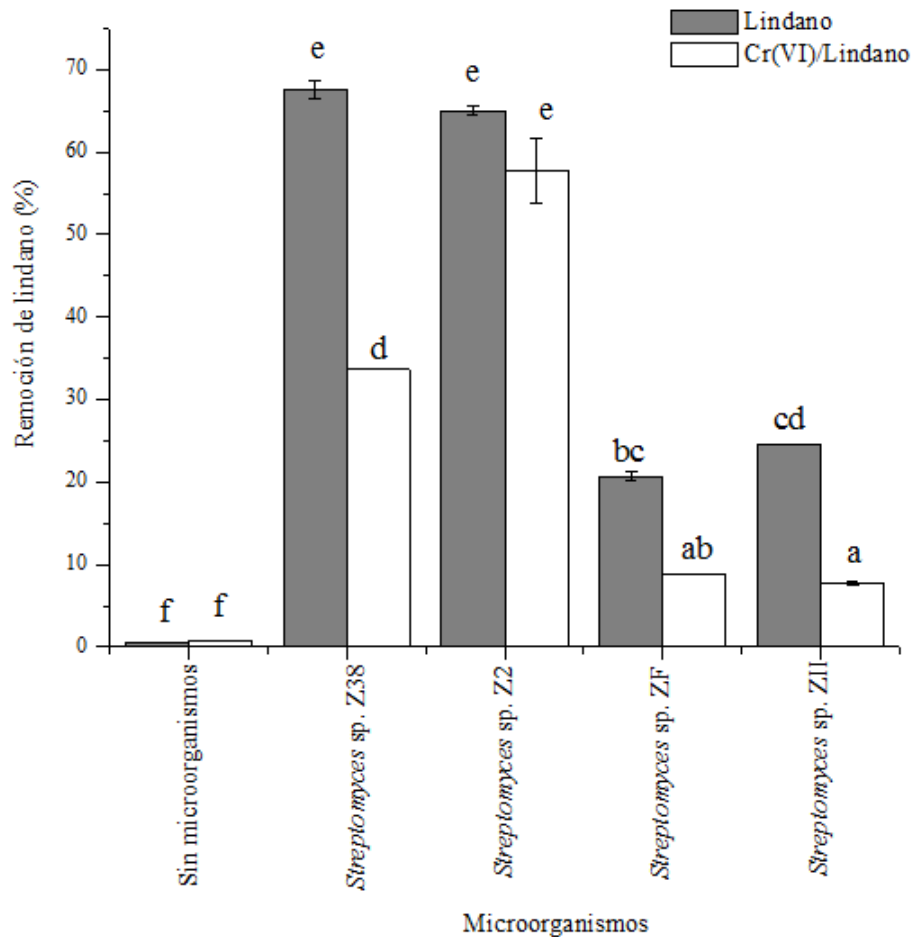
En presencia del compuesto orgánico la disipación de Cr(VI) se vio favorecida por las cuatro cepas en estudio, detectándose porcentajes de remoción del metal significativamente superiores a los obtenidos en medio contaminado ( $p < 0,05$ ). Polti y col (2010), confirmaron la presencia en *Streptomyces* sp. MC1 de una enzima cromato reductasa, demostrando la naturaleza enzimática de la reducción de Cr(VI) en este género de bacterias. Por su parte, Mansilla (2016) detectó en el genoma de *Streptomyces* sp. M7 una enzima anotada como 2,4-dienoyl-CoA reductasa [NADPH] además de otras probables cromato reductasas, involucradas en la reducción de Cr(VI). Teniendo en cuenta el carácter inespecífico de las enzimas reductasas se podría suponer que el mayor porcentaje de remoción de Cr(VI) en el medio de cultivo co-contaminado, sería resultado de un incremento de la actividad de estas enzimas. Esta hipótesis se fundamenta en que en la vía de degradación aeróbica del lindano se forman como metabolitos intermediarios compuestos dienos (Lal y col., 2010), que podrían inducir la expresión de los genes que codifican para la síntesis de enzimas reductasas que actúan en la reducción de compuestos olefínicos, (entre otros) similares a los intermediarios de la degradación del plaguicida.



**Figura 3.4.** Remoción de Cr(VI) por las cepas de *Streptomyces* sp. cultivadas en medio mínimo suplementado con 5 g L<sup>-1</sup> de glucosa y contaminado con 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y/o 0,25 mg L<sup>-1</sup> de lindano (30° C, 7 días, 200 rpm). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Sin microorganismos: control abiótico. Cr(VI): medio contaminado. Cr(VI)/lindano: medio co-contaminado.

En cuanto a la disipación de lindano, la mayor remoción (~65%) fue provocada por *Streptomyces* sp. Z2 y *Streptomyces* sp. Z38. Asimismo, en el medio de cultivo co-contaminado, la máxima remoción del plaguicida se obtuvo por *Streptomyces* sp. Z2 (60%), demostrando que la remoción no se vio afectada por la presencia de Cr(VI) (**Figura 3.5**). Se sabe que la degradación microbiana de contaminantes orgánicos generalmente corresponde a un sistema inducible; sin embargo la presencia de metales pesados puede producir un efecto inhibitorio (Moreira y col., 2013; Polti y col., 2014; Pornwongthong y col., 2014). Teniendo

en cuenta la co-existencia de metales pesados y compuestos orgánicos en el medio ambiente, resulta importante buscar microorganismos que presenten mecanismos de resistencia a metales pesados y contengan genes que codifiquen enzimas capaces de degradar compuestos orgánicos tóxicos (Van Zwieten y col., 2003). Por ello, en base a los perfiles de remoción de Cr(VI) y lindano obtenidos en MM<sub>5</sub> co-contaminado, se seleccionaron *Streptomyces* sp Z2 y *Streptomyces* sp. Z38 para continuar con los ensayos posteriores.



**Figura 3.5.** Remoción de lindano por las cepas de *Streptomyces* sp. cultivadas en medio mínimo suplementado con 5 g L<sup>-1</sup> de glucosa y contaminado con 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y/o 0,25 mg L<sup>-1</sup> de lindano (30° C, 7 días, 200 rpm). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Sin microorganismos: control abiótico. Lindano: medio contaminado. Cr(VI)/Lindano: medio co-contaminado.

### 3.6.2 Desempeño de *Streptomyces* sp. Z2 y *Streptomyces* sp. Z38 en medios de cultivo contaminados en presencia de exudados radiculares de maíz

Varios trabajos demostraron una mayor disipación de contaminantes orgánicos e inorgánicos en la rizósfera debido al aumento en la densidad y/o actividad microbiana, estimulada por los exudados radiculares liberados por plantas (Becerra y col., 2012; Curl y Truelove, 1996; Kidd y col., 2007). En este sentido, se evaluó el efecto de los ERs de plantas de maíz sobre el crecimiento y remoción de Cr(VI) y lindano por las cepas de *Streptomyces* sp. Z2 y *Streptomyces* sp. Z38 usando como control MM suplementado con  $1\text{ g L}^{-1}$  de glucosa (MM<sub>1</sub>).

En primera instancia se estudió la composición química parcial de los productos vegetales.

#### 3.6.2.1 Composición química parcial de los exudados radiculares de plantas de maíz

Las plantas secretan durante su crecimiento una variedad de compuestos orgánicos tales como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y enzimas (Kuiper y col., 2004). La composición y concentración de los compuestos presentes en los productos vegetales varía no solo entre especies, sino también entre miembros de una misma especie. En este sentido, se determinó la composición química parcial de los ERs de plantas de maíz, para evaluar sus potencialidades como estimulantes del crecimiento microbiano y en la remoción de los contaminantes. Se determinó que 1 g de liofilizado de ERs correspondía a la cantidad de producto vegetal secretado por 5 plantas de maíz [ $\sim 3,7$  g peso fresco (PF) raíz] cultivadas en condiciones de hidroponía, durante 14 días. El contenido de carbono orgánico total fue de  $34,1\text{ mgC g}^{-1}$  ERs. El contenido de azúcares fue de  $8,2\text{ mg g ERs}^{-1}$ , mientras que la concentración de proteínas totales fue de  $1,1\text{ mg g ERs}^{-1}$ .

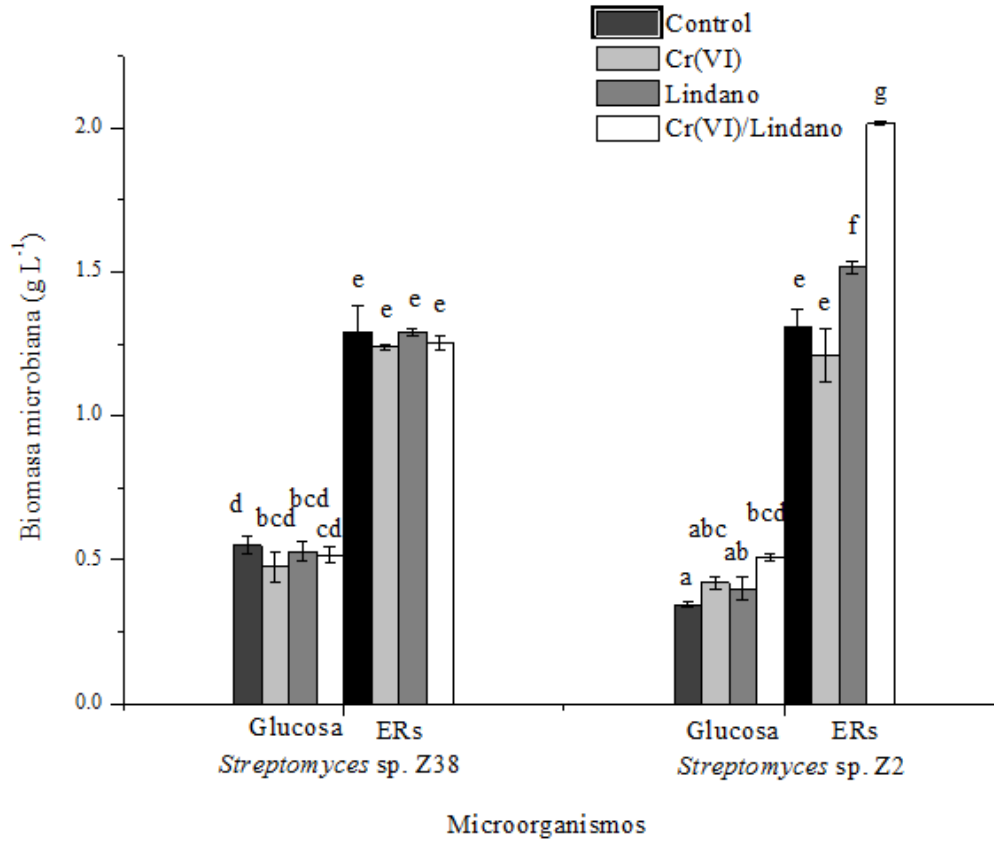
Los ERs de ciertos vegetales pueden emulsificar las moléculas de un xenobiótico modificando su biodisponibilidad. En este sentido, se determinó la actividad emulsificante de los ERs de maíz hacia el kerosene, obteniéndose un índice de emulsificación del 25%. Esto indica que los ERs obtenidos a partir de maíz redujeron la tensión superficial entre las



moléculas hidrofóbicas de kerosene en solución acuosa, facilitando la formación de una emulsión (Calvo y col., 2009).

### 3.6.2.2 Efecto de los exudados radiculares sobre el crecimiento microbiano

Al evaluar el crecimiento microbiano se observó que ambas cepas crecieron en MM suplementado con ERs alcanzando una biomasa microbiana significativamente mayor con relación al control ( $p < 0,05$ ) (**Figura 3.6**). De manera similar, Becerra Castro y col. (2012) demostraron que el crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* y *Sphingomonas* sp. fue mayor cuando las bacterias crecían en presencia de la planta *Cytisus striatus* en comparación a la biomasa microbiana obtenida en ausencia de la leguminosa. Los componentes de los ERs tales como azúcares, aminoácidos, enzimas, vitaminas y factores de crecimiento estimularían el crecimiento microbiano (Oliveros-Bastidas y col., 2009).

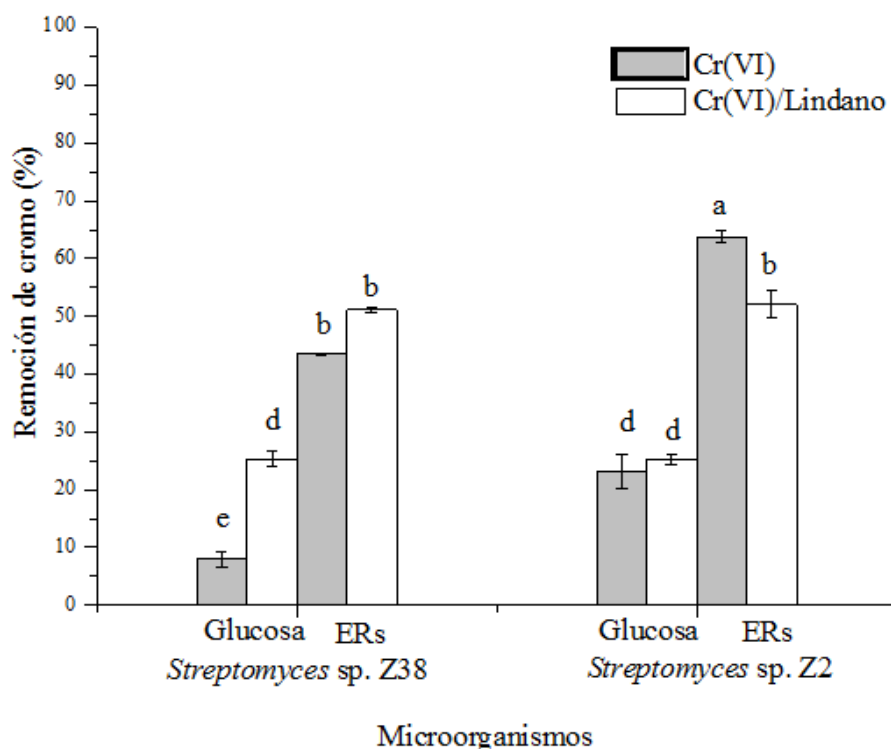


**Figura 3.6.** Biomasa microbiana de las cepas de *Streptomyces sp. Z38* y *Streptomyces sp. Z2* cultivadas en medio mínimo suplementado con exudados radiculares (ERs) de maíz (0,4 g C L<sup>-1</sup>) o glucosa (1 g L<sup>-1</sup>) y contaminado con 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y/o 0,25 mg L<sup>-1</sup> de lindano (30° C, 7 días, 200 rpm). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Control: medio sin contaminantes. Cr(VI); Lindano: medio contaminado. Cr(VI)/Lindano: medio co-contaminado.

### 3.6.2.3 Efecto de los exudados radiculares de maíz en la remoción de Cr(VI) y lindano

Se evaluó la remoción de Cr(VI) en el control abiótico (sin microorganismos), y se observó que los compuestos presentes en los ERs no removieron el metal en las condiciones de laboratorio establecidas. Sin embargo, en presencia de *Streptomyces sp. Z2* y *Streptomyces sp. Z38* se observó una remoción significativa de Cr(VI) en comparación al control. (**Figura**

3.7). En el medio co-contaminado, también se observó una remoción significativamente mayor del metal en presencia de los ERs de maíz.



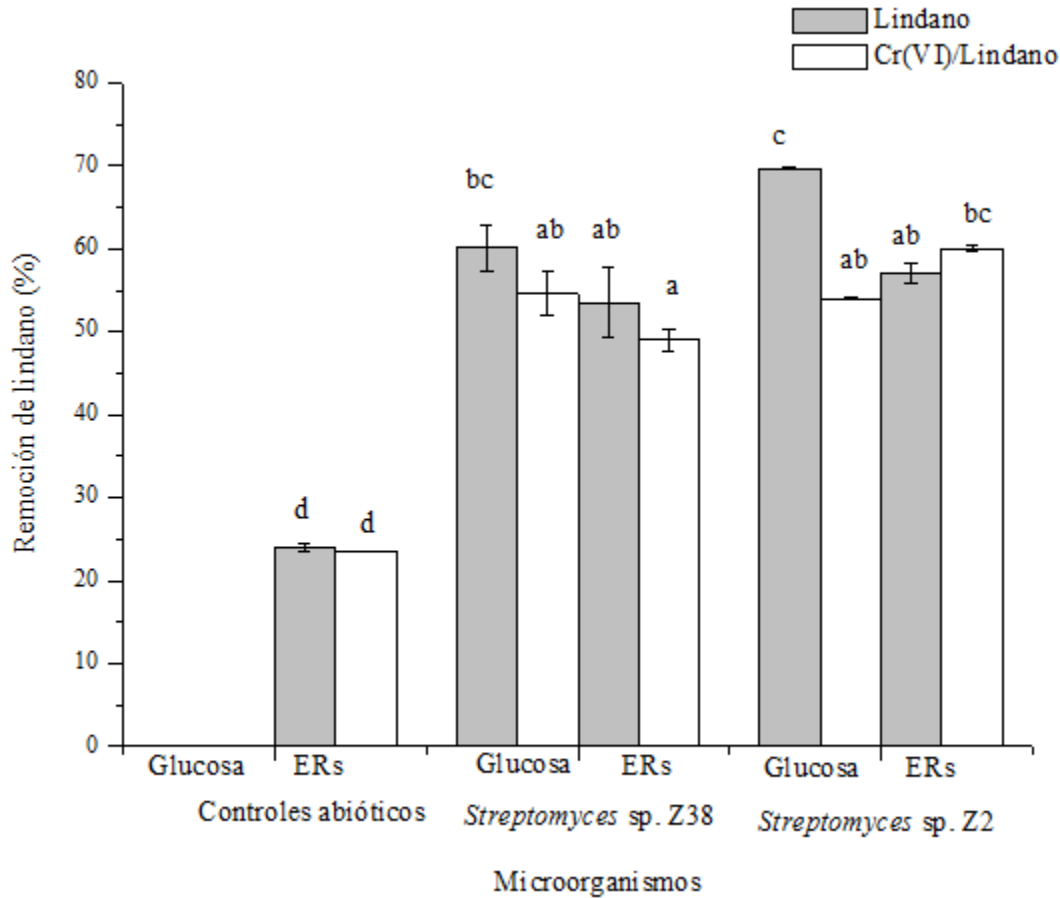
**Figura 3.7.** Remoción de Cr(VI) por las cepas de *Streptomyces* sp. Z38 y *Streptomyces* sp. Z2 cultivadas en medio mínimo suplementado con exudados radiculares ( $0,4 \text{ g C L}^{-1}$ ) o glucosa ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) y contaminado con  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) y/o  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  de lindano ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 7 días, 200 rpm). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Controles abióticos: Sin microorganismos (no se detectó remoción). Cr(VI): medio contaminado. Cr(VI)/Lindano: medio co-contaminado.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la remoción de metal estaría relacionada directamente a la actividad microbiana. La reducción microbiana de Cr(VI) puede ser explicada por dos modelos principales: la reducción directa (enzimática), y la reducción indirecta (no enzimática). Polti y col. (2007) confirmaron que la reducción de Cr(VI) por *Streptomyces* sp. MC1 es llevada a cabo por una cromato reductasa intracelular NADH dependiente. Estos autores demostraron que la utilización de este cofactor como dador de electrones incrementaba la actividad enzimática en un 40% en las bacterias, con respecto a

NADPH. Sin embargo, las bacterias reductoras de Cr(VI) pueden usar una variedad de compuestos orgánicos como dadores de electrones para alcanzar una actividad óptima (Puzon y col., 2002). Por ello, los componentes presentes en los ERs podrían servir como dadores de electrones para estimular la reducción de Cr(VI) a Cr(III). Por otra parte, la reducción de Cr(VI) puede ocurrir por condiciones proporcionadas por la población bacteriana tales como el potencial redox o metabolitos bacterianos producidos. De acuerdo con esto, el crecimiento microbiano en presencia de ERs de maíz podría modificar las condiciones del medio favoreciendo la reducción no enzimática de Cr(VI) (Zazo y col., 2008).

Con respecto a la disipación del plaguicida, se detectó 24% de remoción en los controles abióticos suplementados con ERs. De acuerdo a la actividad emulsificante previamente determinada en los ERs, se podría explicar la remoción abiótica del plaguicida debido a que dada su naturaleza físico-química, el lindano podría unirse a los ácidos orgánicos y otros componentes carbonados de los productos vegetales. Al respecto, Álvarez y col. (2012) también detectaron remoción no biológica de lindano (42%) en un medio de cultivo líquido suplementado con ERs de maíz de una variedad diferente a la empleada en este trabajo de Tesis, además de observar un comportamiento micelar de los ERs en solución. Los autores hipotetizaron que los productos vegetales habrían formado una matriz compleja en la cual el plaguicida quedaría retenido y de ahí su disminución.

En cuanto a la remoción microbiana de lindano, se alcanzaron valores de disipación del plaguicida superior al 48% en todas las condiciones de cultivo (**Figura 3.8**). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando las bacterias crecieron en presencia de ERs o glucosa.

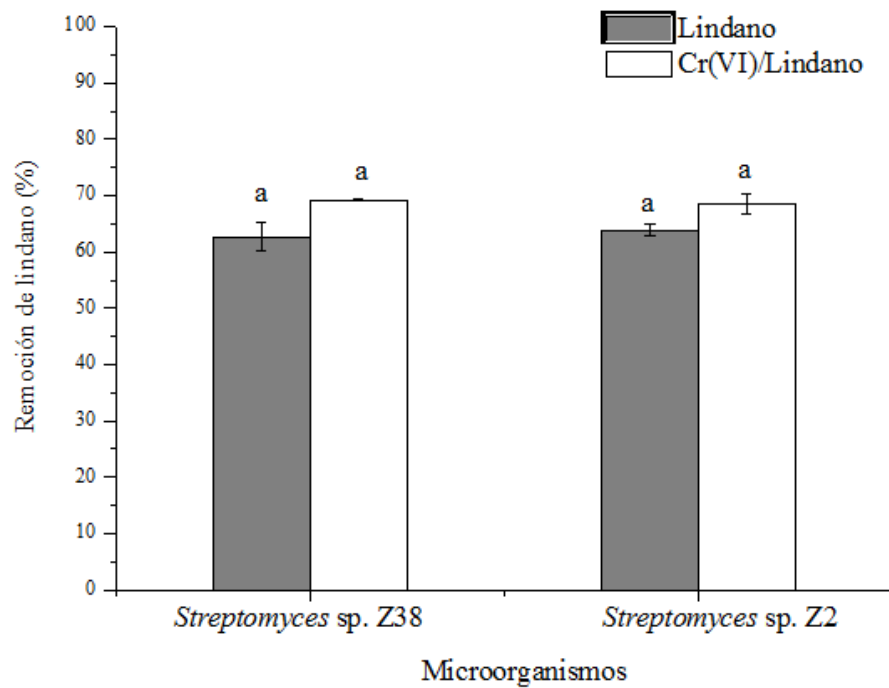


**Figura 3.8.** Remoción de lindano por las cepas de *Streptomyces sp. Z38* y *Streptomyces sp. Z2* cultivadas en medio mínimo suplementado con exudados radiculares (ERs) de maíz (0,4 g C L<sup>-1</sup>) o glucosa (1 g L<sup>-1</sup>) y contaminado con 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y/o 0,25 mg L<sup>-1</sup> de lindano (30° C, 7 días, 200 rpm). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Controles abióticos: Sin microorganismos. Lindano: medio contaminado. Cr(VI)/Lindano: medio co-contaminado.

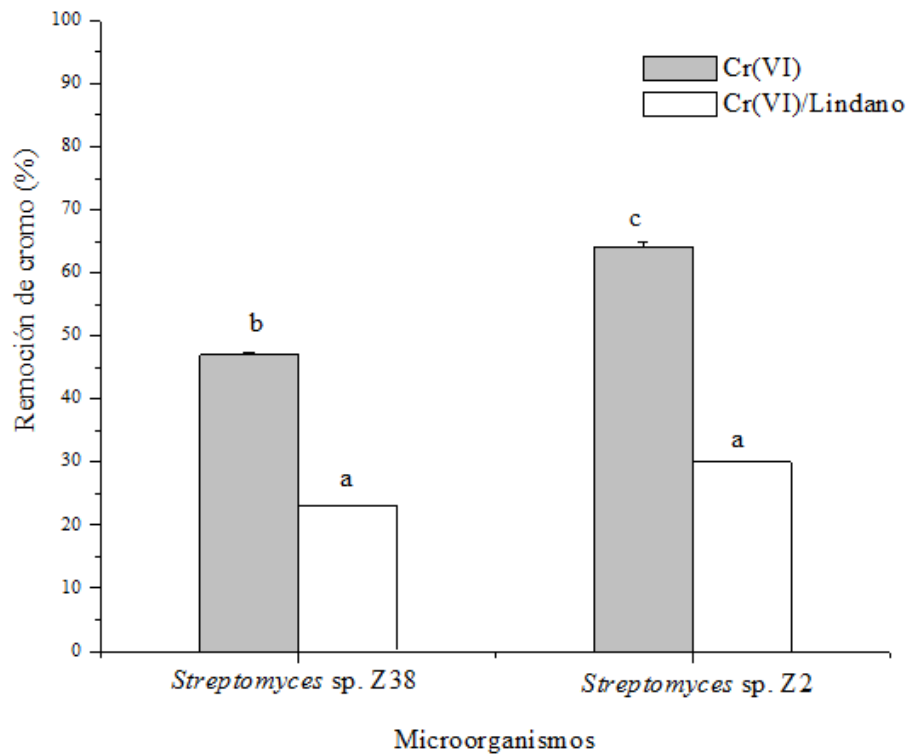
En contraposición a estos resultados Simón Solá y col. (2017) informaron que la remoción de lindano por la cepa de *Streptomyces sp. M7* incrementó significativamente cuando la bacteria se cultivó en MM suplementado con ERs (0,4 g C L<sup>-1</sup>) de una variedad de maíz distinta a la empleada en este trabajo, en comparación a los valores obtenidos en MM con glucosa (1 g L<sup>-1</sup>) (30° C, 5 días, 200 rpm). Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta que, además de tratarse de cepas distintas, los ERs son una mezcla compleja de

compuestos, algunos de los cuales podrían reprimir y/o disminuir las actividades degradativas en ciertos microorganismos. En este sentido, Louvel y col. (2011) informaron que los ERs de diferentes especies vegetales reprimían la actividad degradadora de fenantreno de una cepa de *Pseudomonas putida*. Es conocido que las características químicas de los productos vegetales varían no solo entre especies, sino también entre miembros de una misma especie, sobre todo en plantas como el maíz, de las que existen múltiples variedades (Nardi y col., 2002).

En un ensayo posterior se incrementó la concentración de lindano ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) en el medio de cultivo suplementado con ERs. Se observó que la remoción del plaguicida continuaba siendo elevada en dicho sistema (~70%) en contraposición a lo que sucedió con el Cr(VI) en el medio de cultivo co- contaminado, cuya remoción disminuyó significativamente (**Figura 3.9 y Figura 3.10**). Teniendo en cuenta que el co-metabolismo es el mecanismo comúnmente utilizado por las bacterias que degradan xenobióticos (Schrijver y Mot, 1999), posiblemente las cepas de *Streptomyces* sp. utilizarían en primera instancia los exudados de la raíz como fuente de energía para degradar el lindano. Luego el carbono residual podría ser utilizado para la reducción de cromo. Este comportamiento implicaría una mayor contribución energética y enzimática a la eliminación de la mayor concentración de lindano.



**Figura 3.9.** Remoción de lindano por las cepas de *Streptomyces sp. Z38* y *Streptomyces sp. Z2* cultivadas en medio mínimo suplementado con exudados radiculares (ERs) de maíz ( $0,4 \text{ g C L}^{-1}$ ) y contaminado con  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de lindano y/o  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) ( $30^\circ \text{ C}$ , 7 días, 200 rpm). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Lindano: medio contaminado. Cr(VI)/Lindano: medio co-contaminado.



**Figura 3.10.** Remoción de Cr(VI) por las cepas de *Streptomyces* sp. Z38 y *Streptomyces* sp. Z2 cultivadas en medio mínimo suplementado con exudados radiculares (ERs) de maíz ( $0,4 \text{ g C L}^{-1}$ ) y contaminado con  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de lindano y/o  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Cr(VI): medio contaminado. Cr(VI)/Lindano: medio co- contaminado.

En base al buen desempeño de ambos microorganismos en MM contaminado y en presencia de productos vegetales, se evaluó a continuación el comportamiento del sistema planta-bacteria en suelo contaminado. Para este ensayo se decidió emplear la cepa de *Streptomyces* sp. Z38 debido a que presentó mayor crecimiento y esporulación en los medios de cultivos utilizados, lo que favorecería su reproducción y propagación en suelo. Además, el genoma de esta cepa fue recientemente secuenciado, lo que complementará los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis.



### 3.7 Bioensayo en suelo

Las interacciones entre las plantas, sus microorganismos asociados y los contaminantes se estudiaron durante muchos años debido a las aplicaciones exitosas del sistema planta-microorganismo en estrategias de fitorremediación. Según Vangronsveld y col. (2009) el éxito de la fitorremediación radica en la comprensión de las complejas interacciones entre contaminantes, suelo, plantas y microorganismos.

Teniendo en cuenta la gran complejidad de las interacciones que ocurren en la rizósfera de los sistemas naturales, se realizó un ensayo en suelo para conocer una fracción de lo que podría ocurrir en la naturaleza. Por ello, se evaluó la remoción de Cr(VI) y/o lindano en suelo contaminado, por la combinación entre *Streptomyces* sp. Z38 y plantas de maíz.

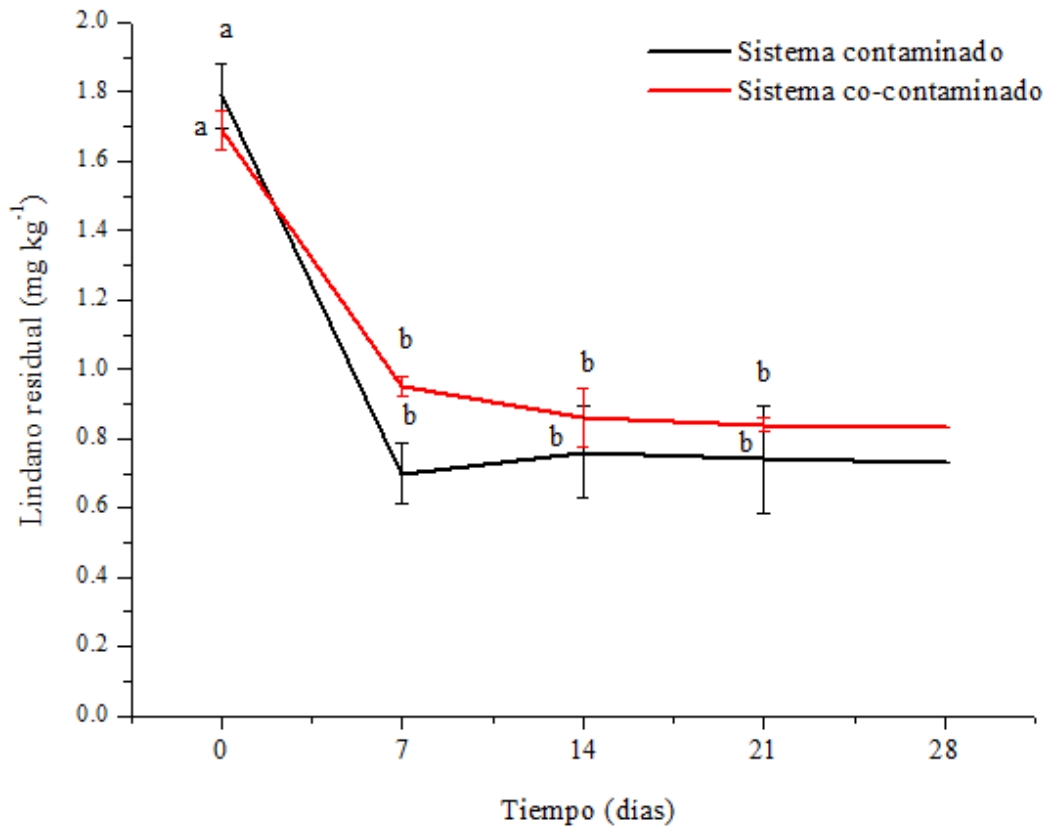
#### 3.7.1 Determinación de la estabilidad de Cr(VI) y lindano en suelo

Los suelos representan el mayor depósito de contaminantes orgánicos e inorgánicos, pero en general, una fracción representativa de estos contaminantes no se encuentra disponible para los organismos. Dentro de la fracción disponible, aquella que se encuentra disuelta en la fase acuosa suele resultar tóxica para los seres vivos (fracción biodisponible). La solubilidad y biodisponibilidad de los contaminantes dependerá de las características fisicoquímicas de cada tipo de suelo (Lu y Shan, 2005).

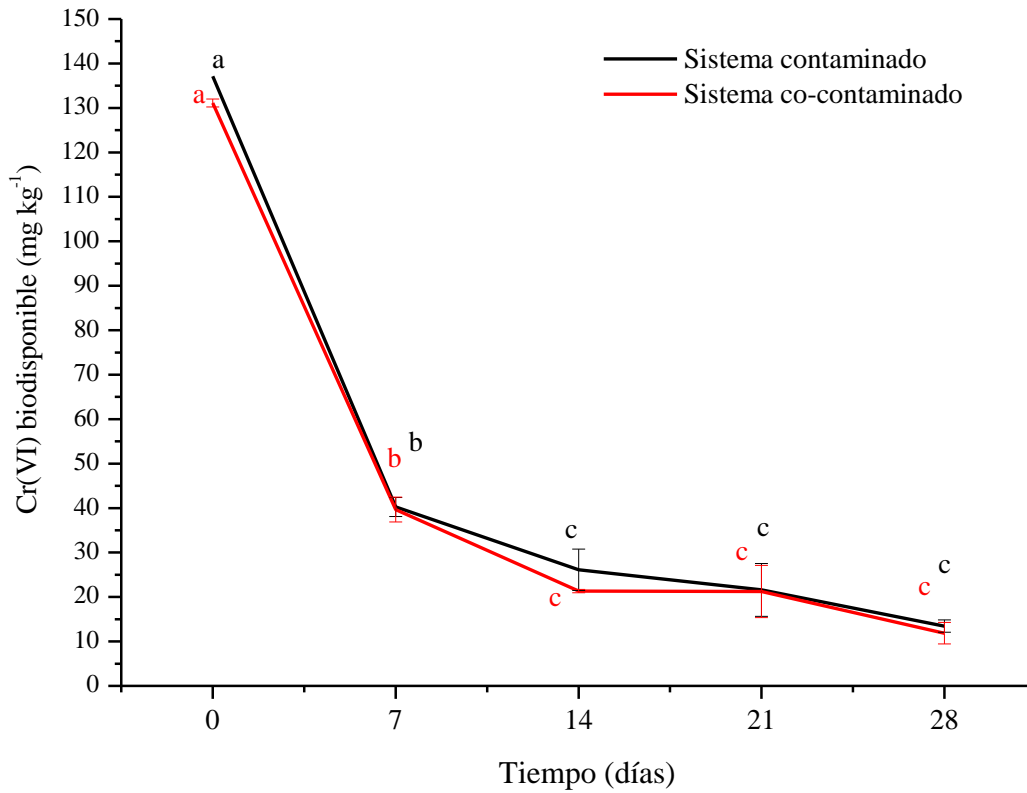
Teniendo en cuenta este aspecto, se estudió en el presente trabajo de Tesis el tiempo en el cual se estabilizaban las interacciones fisicoquímicas entre el suelo empleado y el Cr(VI) y/o lindano. Para ello, se contaminó un sistema suelo-arena no estéril con  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cr(VI) y/o  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  de lindano y se incubó durante 28 días bajo condiciones ambientales controladas.

Se evaluaron las curvas de estabilidad de ambos contaminantes en el sistema contaminado y co-contaminado. Se determinó que las interacciones fisicoquímicas entre el suelo y el plaguicida se estabilizaron a los 7 días. La concentración de lindano residual alcanzada fue de  $0,70 \pm 0,08 \text{ mg kg}^{-1}$  en ausencia del metal y  $0,90 \pm 0,03$  en presencia del metal (**Figura 3.11**). Por su parte, el cromo se estabilizó en el suelo a los 14 días, con una concentración de Cr(VI) biodisponible [ $\text{Cr(VI)}_B$ ] de  $26,10 \pm 4,63 \text{ mg kg}^{-1}$  en el sistema

contaminado y  $21,3 \pm 0,37 \text{ mg kg}^{-1}$  en el sistema co-contaminado (**Figura 3.12**). Las concentraciones de lindano residual y  $\text{Cr(VI)}_B$  no cambiaron significativamente después de los 7 y 14 días, respectivamente.



**Figura 3.11.** Curva de estabilización de lindano en un sistema suelo:arena no estéril contaminado artificialmente con  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  de lindano (sistema contaminado) y  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  de lindano y  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $\text{Cr(VI)}$  (sistema co-contaminado). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher).



**Figura 3.12.** Curva de estabilización de Cr(VI) en un sistema suelo:arena no estéril contaminado artificialmente con  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cr(VI) (sistema contaminado) y  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cr(VI) y  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  de lindano (sistema co-contaminado). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher).

La variación en la movilidad, solubilidad y biodisponibilidad de los contaminantes en los suelos está influenciada por diferentes parámetros tales como pH, humedad, temperatura, composición, edad del suelo y concentración de los contaminantes (Bradl, 2004). Por ejemplo, Aparicio (2018) determinó que luego de 14 días en un suelo co-contaminado, el Cr(VI) se estabilizaba en  $26 \text{ mg kg}^{-1}$  partiendo de una concentración inicial de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ . Con respecto al lindano, y a diferencia de lo observado en el presente trabajo de Tesis, Aparicio (2018) no observó una disminución de la concentración final de lindano luego del periodo de estabilización. Este hecho puede explicarse si consideramos el tipo de suelo utilizado y el efecto de la microbiota propia del sistema que puede promover la disipación de los contaminantes. Por lo mencionado, resulta evidente la cantidad de variables bióticas y

abióticas que determinan la biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo, resaltando la complejidad del sistema, y por lo tanto, de los bioensayos en esta materia.

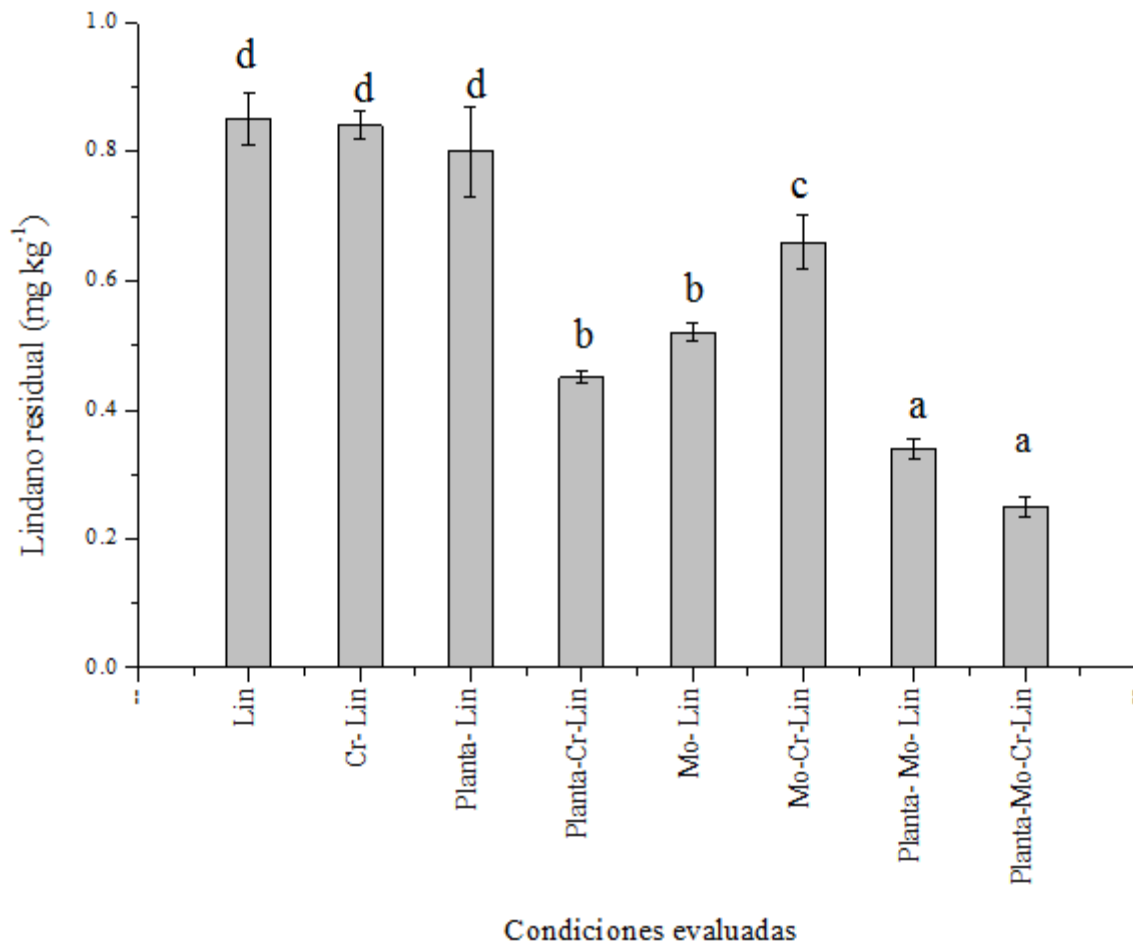
De acuerdo a los resultados obtenidos, se estableció que 14 días era el tiempo necesario para lograr la estabilización de Cr(VI) y/o lindano en el suelo empleado. Por lo tanto, las concentraciones iniciales del siguiente bioensayo correspondieron a aquellas obtenidas luego de 14 días de estabilización.

### 3.7.2 Evaluación de la remoción de Cr(VI) y/o lindano por el sistema planta-microorganismo

Luego de la estabilización de los contaminantes en el suelo, se trasplantaron plantas de maíz de siete días de desarrollo y se inoculó con *Streptomyces* sp. Z38.

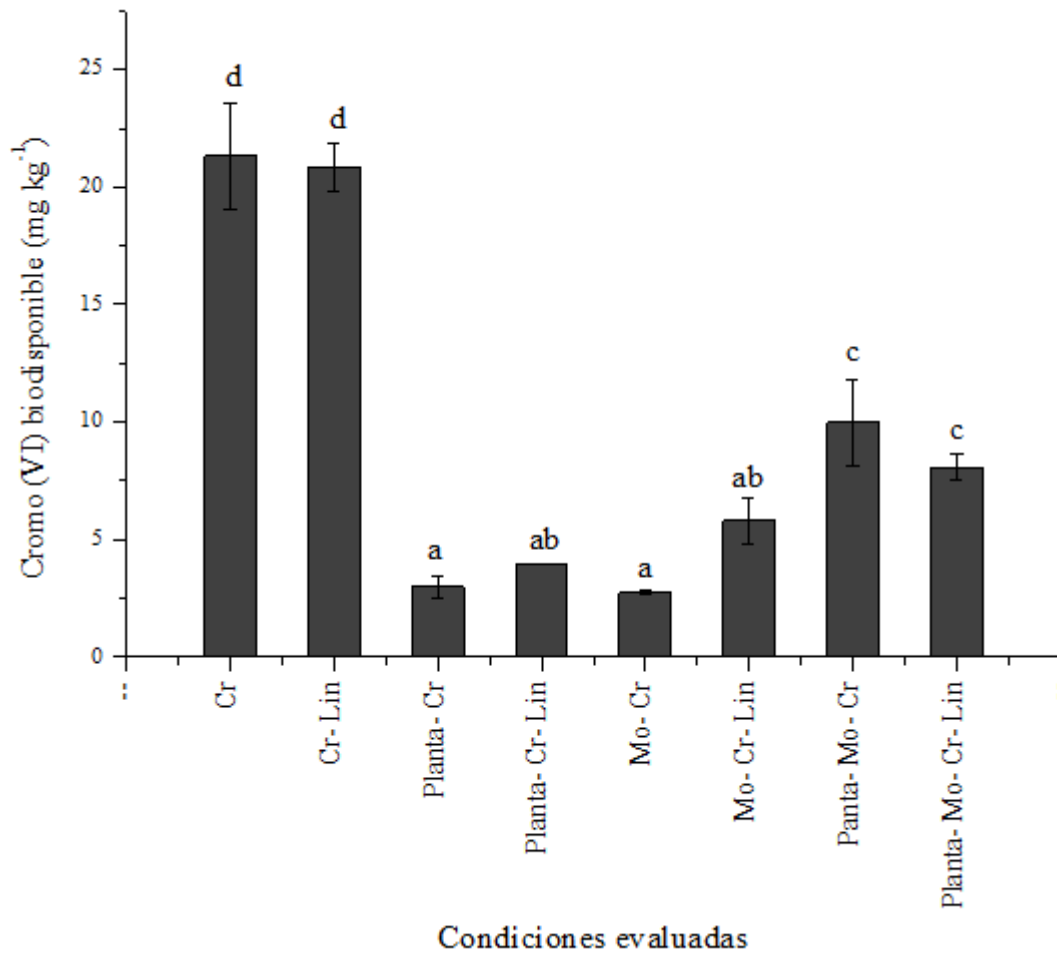
Al evaluar la remoción del plaguicida, se encontró que los máximos valores se alcanzaron en el sistema Planta- microorganismo (Mo). La concentración de lindano (Lin) residual fue de  $0,34 \pm 0,02$  mg kg<sup>-1</sup> en el sistema Planta-Mo-Lin y  $0,25 \pm 0,02$  mg kg<sup>-1</sup> en el sistema Planta-Mo-Cr-Lin ( $p > 0,05$ ). Por su parte, en el sistema Mo-Lin la concentración de plaguicida residual fue de  $0,52 \pm 0,01$  mg kg<sup>-1</sup> y de  $0,66 \pm 0,04$  mg kg<sup>-1</sup> en el sistema Mo-Cr-Lin (**Figura 3.13**). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la concentración residual del plaguicida en el sistema Planta-Lin ( $0,8 \pm 0,07$  mg kg<sup>-1</sup>) y el control abiótico ( $0,85 \pm 0,04$  mg kg<sup>-1</sup>). Estos resultados coinciden con lo reportado en la bibliografía, sobre la eficiencia del sistema planta-bacteria en la disipación de tóxicos orgánicos, en comparación al desempeño microbiano o vegetal solos en la degradación de estos compuestos (Becerra Castro y col., 2012; Böltner y col. 2008; Myriam y Refugio, 2008). Asimismo, sugieren que el enfoque más acertado para la remediación de sitios contaminados con compuestos orgánicos se basa en técnicas de rizodegradación ya que los compuestos liberados por las raíces pueden estimular la actividad degradadora de bacterias rizosféricas (Kidd y col., 2008). En los exudados radiculares vegetales, se encuentran numerosos compuestos aromáticos con estructuras químicas similares a las de varios contaminantes orgánicos, por lo que podrían actuar como inductores para la síntesis de enzimas microbianas implicadas en las vías de degradación (Singer y col., 2003). Por otra parte, De-la-Peña y col. (2008) demostraron que la presencia microbiana puede modular la

exudación de proteínas desde las raíces de las plantas, induciendo la secreción de hidrolasas, peptidasas y peroxidasas vegetales, entre otras. La síntesis de diversas proteínas vegetales juega un papel importante en la comunicación con los microorganismos del suelo y así establece asociaciones compatibles o incompatibles. En este contexto, en presencia de *Streptomyces* sp. Z38, el perfil enzimático vegetal podría ser modificado, exudando las raíces diferentes proteínas, incluidas enzimas con capacidad degradadora del plaguicida.



**Figura 3.13.** Concentración de lindano residual en suelos implantados con maíz inoculado con *Streptomyces* sp. Z38 luego del período de incubación (30 °C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Lin y Cr-Lin: controles abióticos. Planta-Lin; Planta-Cr-Lin; Mo-Lin; Mo- Cr-Lin; Planta-Mo-Lin; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos.

Con relación a la disipación del metal, se encontró que las concentraciones finales de Cr(VI)<sub>B</sub> eran menores cuando la planta y el microorganismo se encontraban separados. En este sentido, los valores de Cr(VI)<sub>B</sub> obtenidos fueron de  $2,97 \pm 0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  en el sistema Planta-Cr;  $2,73 \pm 0,09 \text{ mg kg}^{-1}$  en el sistema Mo-Cr, mientras que la concentración de Cr(VI)<sub>B</sub> obtenida en el sistema Planta-Mo-Cr fue de  $9,97 \pm 1,85 \text{ mg kg}^{-1}$ . Este valor resultó significativamente mayor que el registrado en los sistemas con los organismos individuales (planta o microorganismo) (**Figura 3.14**).



**Figura 3.14.** Concentración de Cr(VI) biodisponible en suelos implantados con maíz inoculado con *Streptomyces* sp. Z38 luego del período de incubación (30 °C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Cr y Cr-Lin: controles abióticos. Planta-Cr; Planta-Lin.Cr; Mo-Cr; Mo-Cr-Lin; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos.

Varios trabajos informan particularmente, que la producción de surfactantes, sideróforos y ácidos orgánicos por parte de microorganismos edáficos juega un papel importante en la complejación de metales, aumentando su solubilidad y movilidad (Braud y col., 2009; Mulligan, 2005; Saravanan y col., 2007). Dependiendo de las condiciones de cultivo o del medioambiente, la síntesis de tales moléculas puede verse favorecida o

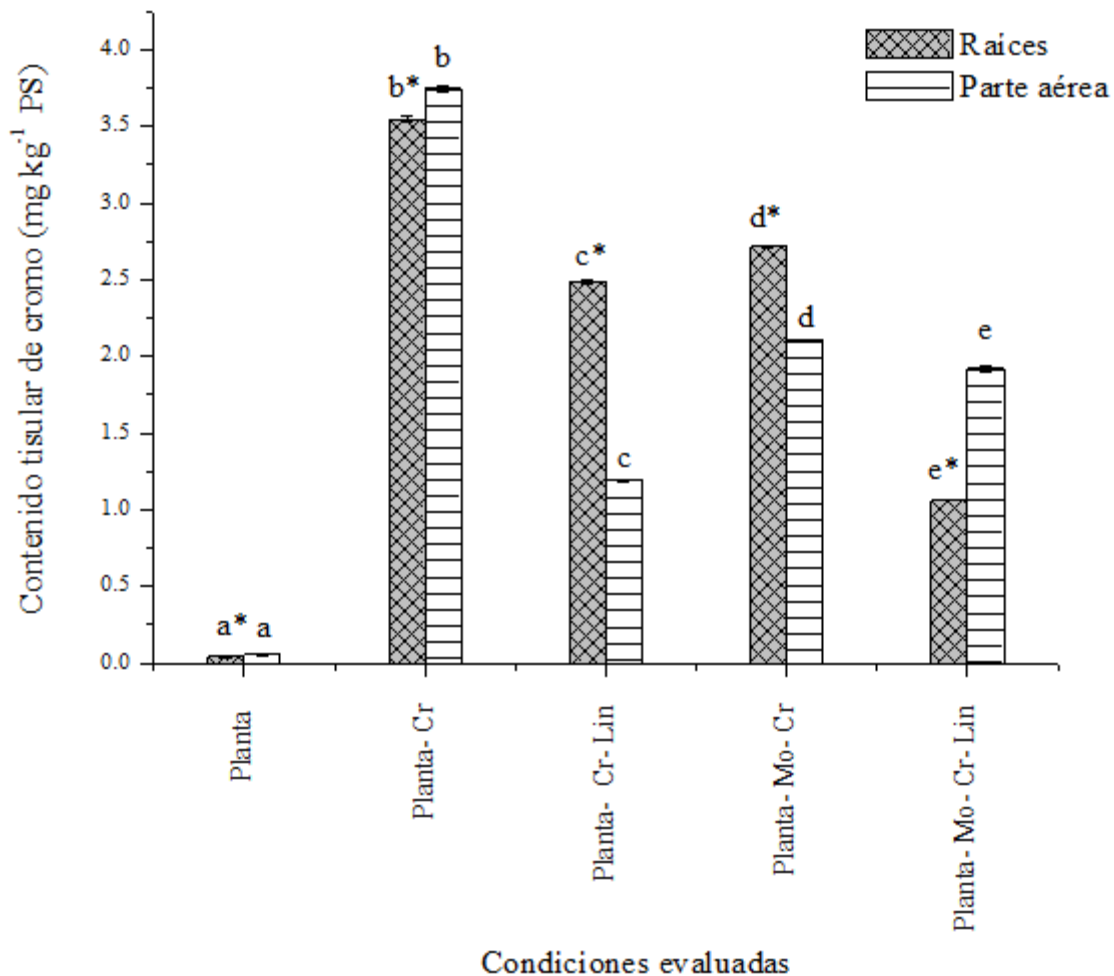
disminuida. En este sentido, en el presente trabajo de Tesis se demostró la capacidad de *Streptomyces* sp. Z38 de producir sideróforos y solubilizar fosfato inorgánico, propiedades probablemente muy propensas a ser expresadas en el sistema suelo-planta- microorganismo, y particularmente, en condiciones de deficiencia de nutrientes y concentraciones tóxicas de metales (Becerra-Castro y col., 2012) como las que se establecieron en este trabajo. Esta premisa podría explicar los valores elevados de  $\text{Cr(VI)}_B$  obtenidos en el sistema planta-microorganismo (Planta-Mo-Cr y Planta-Mo-Cr-Lin), partiendo de la hipótesis de que la síntesis de moléculas promotoras del crecimiento vegetal y otras biomoléculas anfipáticas habría favorecido la movilización y solubilización del Cr(VI) adsorbido al suelo. Por su parte, las plantas modifican las propiedades del suelo y alteran la movilidad de metales pesados (Chen y col., 2014; Irizar y col., 2014; Kwon y col., 2013). Si bien la producción y la liberación de compuestos desde las raíces son procesos comúnmente constitutivos, la planta responde a factores externos secretando compuestos químicos para protegerse de efectos negativos o bien establecer interacciones positivas con otros organismos (Bradl y col., 2004). Por ejemplo, Lamont (2003), informó que la deficiencia de nutrientes aumentaba la exudación de ciertos metabolitos que permiten aumentar la captación de compuestos inorgánicos por parte de las plantas.

### 3.7.3 Análisis de cromo en tejidos vegetales

El maíz es un cereal que se conoce por su capacidad para acumular metales pesados (Vijayarengan, 2005). Si bien no es señalado como una especie hiperacumuladora, presenta atributos que pueden ser una compensación suficiente para considerar su uso en la fitoextracción de metales pesados del suelo. Este cereal crece rápidamente de manera anual, produce abundante biomasa, numerosas raíces fasciculadas y soporta varios efectos ambientales adversos (Fulekar, 2008; Garbisu y Alkorta, 2001; Zhang y col, 2009). En este sentido, se determinó el contenido de cromo total en raíces y parte aérea de las plantas de maíz debido a que las mismas presentaban un aspecto macroscópico desfavorable. En el sistema Planta-Cr se detectó la máxima acumulación del metal en los tejidos vegetales. El valor de Cr tisular en raíces fue de  $3,55 \pm 0,02 \text{ mg g PS}^{-1}$  mientras que en la parte aérea fue



de  $3,75 \pm 0,02 \text{ mg g PS}^{-1}$ . Por el contrario, en el sistema Planta-Mo-Cr, la acumulación tisular del metal fue significativamente menor con relación al sistema no inoculado (**Figura 3.15**).



**Figura 3.15.** Contenido tisular de cromo en raíces y parte aérea de plantas de maíz inoculadas con *Streptomyces* sp. Z38 luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Planta: control biótico. Planta-Cr; Planta-Cr-Lin.; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos.

Un número considerable de estudios sugieren que la inoculación de plantas con microorganismos productores de moléculas quelantes incrementa la biodisponibilidad de metales en la rizósfera, aumentando la capacidad de captación por las especies vegetales (Braud y col. 2009; Dimka y col., 2009). No obstante, otras investigaciones demostraron que la inoculación bacteriana no siempre conduce al aumento de la absorción de metales por las plantas. Los resultados encontrados en este trabajo coinciden con esta premisa, ya que el contenido tisular de cromo en las plantas de maíz inoculadas con *Streptomyces* sp. Z38 fue menor comparado con los otros tratamientos. Al inocular plantines de *Cucurbita pepo* y *Brassica juncea* con la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, Sinha y Mukherjee (2008) encontraron que la captación de cadmio se veía reducida tanto en raíces como en hojas de ambas especies. De manera similar, Tripathi y col. (2009) demostraron que la inoculación con una cepa *Pseudomonas putida*, productora de sideróforos, reducía la acumulación de Cd en raíces y hojas de una especie vegetal. Otras investigaciones como la realizada por Burd y col. (2000) detectaron un menor contenido tisular de zinc en plantas de canola inoculadas con *Kluyvera ascorbata*.

Como se mencionó previamente, la cepa de *Streptomyces* sp. Z38 cultivada con plantas de maíz podría incrementar la movilización de Cr(VI) y conducir a una mayor disponibilidad del metal. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a la captación de los metales son en gran parte dependientes de la especie vegetal, así como también de otros factores. Ente ellos se puede mencionar la forma de unión de los metales, carga y tipo de acomplejantes orgánicos presentes en el suelo (Neubauer y col., 2002).

En el sistema co-contaminado Planta-Cr-Lin, el contenido de cromo tisular fue de  $2,48 \pm 0,01$  mg g PS<sup>-1</sup> en raíces y  $1,29 \pm 0,01$  mg g PS<sup>-1</sup> en la parte aérea, mientras que en el sistema Planta-Mo-Cr-Lin, el contenido de cromo tisular fue de  $1,06 \pm 0,01$  mg g PS<sup>-1</sup> en raíces y  $1,92 \pm 0,02$  mg g PS<sup>-1</sup> en la parte aérea. Estos resultados sugieren que la presencia del plaguicida habría interferido disminuyendo la acumulación tisular del cromo. Varios autores observaron un efecto similar en la acumulación de metales pesados por plantas cultivadas en presencia de compuestos orgánicos (Chen y col., 2004; Hechmi y col., 2014). Por ejemplo, Chigbo y col. (2013) evaluaron la acumulación de cobre en tejidos de *Brassica juncea* al crecer en un suelo co-contaminado con pireno, informando una reducción del 90%

en la acumulación de cobre por la planta. Según lo sugerido por Zhang y col. (2009), la disminución de la capacidad fitoextractora de un metal en presencia de un contaminante orgánico, podría deberse a un fenómeno de competencia entre el compuesto orgánico e inorgánico co- existente por ser adsorbidos por las raíces de las plantas.

### 3.7.4 Evaluación del crecimiento vegetal

La presencia de plaguicidas y metales pesados en el suelo puede afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas. Sin embargo, los efectos del cromo son más evidentes, y por lo tanto, son ampliamente investigados. La mayoría de las especies vegetales exhiben síntomas visibles de toxicidad a dicho metal tales como retraso del crecimiento, clorosis, necrosis, pardeamiento de la raíz, e incluso la muerte (Shanker y col., 2005).

De acuerdo con esto, se analizaron los efectos del Cr(VI) principalmente, sobre el aspecto macroscópico de las plantas de maíz luego de 14 días de exposición.

Las plantas que crecieron en suelo sin contaminar y suelo contaminado solo con lindano, presentaron hojas de gran tamaño, erguidas y de coloración verdosa con pocas manchas amarillentas, independientemente de la inoculación microbiana. El sistema radicular se observó abundante y fuerte (**Figura 3.16A,B**).

En presencia de Cr(VI), las plantas presentaron síntomas de toxicidad tales como clorosis, hojas con los bordes secos y disminución de su tamaño, independientemente de la inoculación microbiana. El sistema radicular en estas condiciones se observó escaso y débil (**Figura 3.17A,B**).

**Figura 3.16.** Aspecto macroscópico de las plantas de maíz (*Zea mays*) desarrolladas en suelos sin cromo A)- en ausencia de *Streptomyces* sp. Z38 y B)- en presencia de *Streptomyces* sp. Z38 luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Lin: lindano; Mo: microorganismo. Planta; Planta-Mo: controles bióticos. Planta-Lin; Planta-Mo-Lin: tratamientos biológicos.

A)

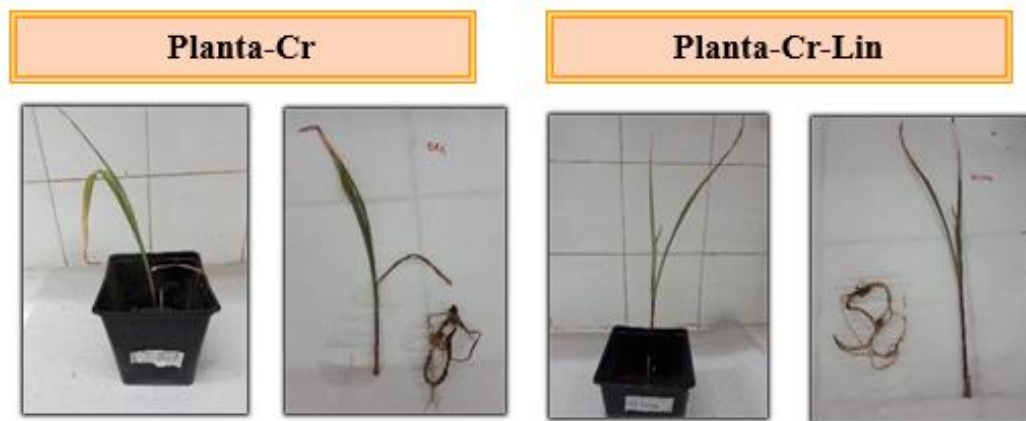


B)

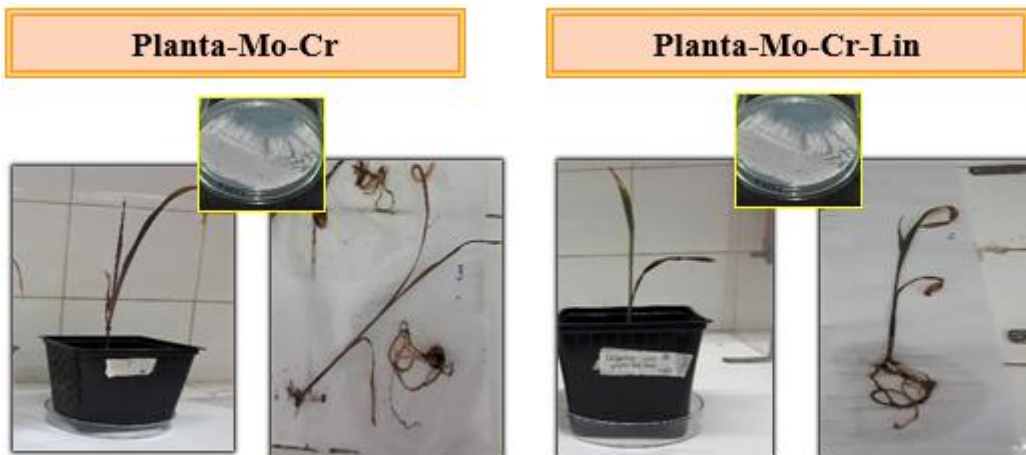


**Figura 3.17.** Aspecto macroscópico de las plantas de maíz (*Zea mays*) desarrolladas en los sistemas contaminados con Cr(VI) A)- en ausencia de *Streptomyces* sp. Z38 y B)- en presencia de *Streptomyces* sp. Z38) luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Planta-Cr; Planta-Cr-Lin; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos.

A)

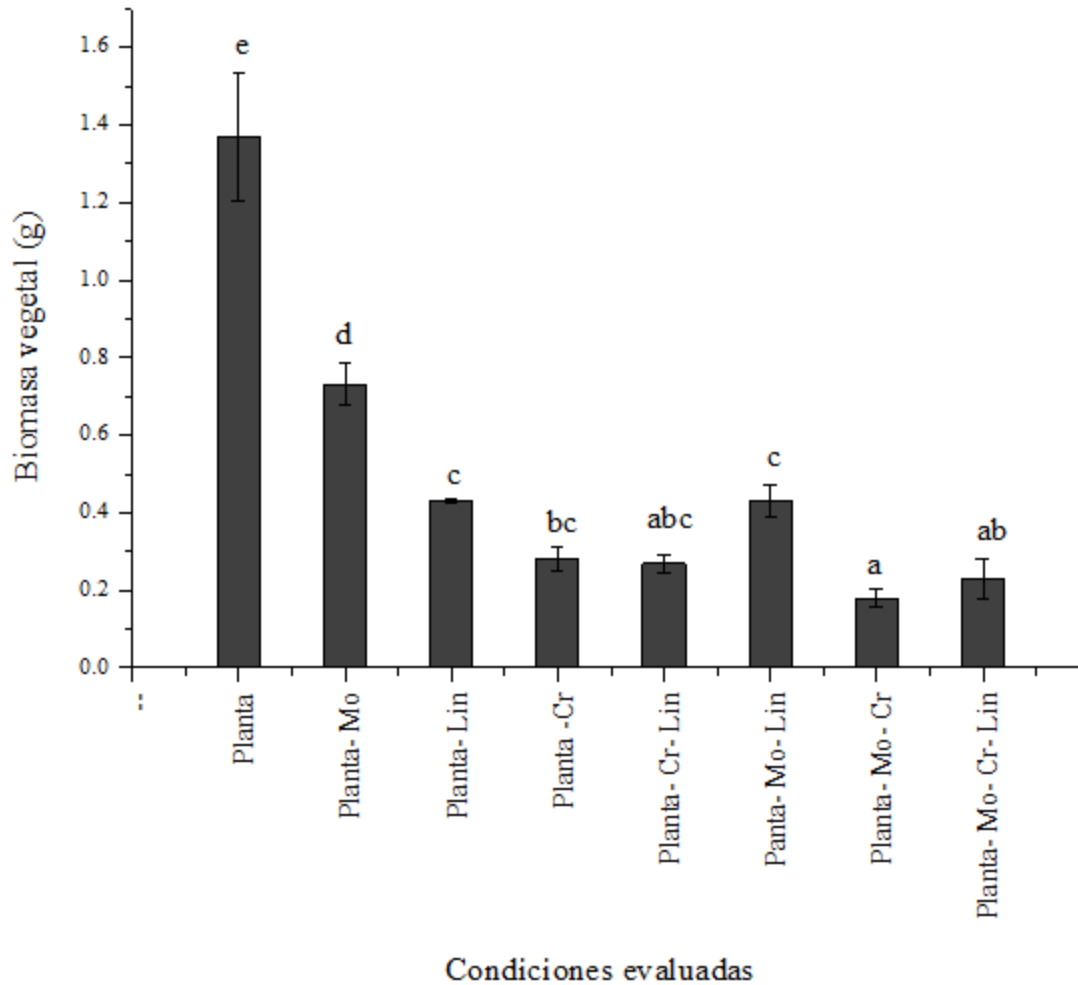


B)



### 3.7.4.1 Biomasa vegetal

El peso seco de las plantas de maíz desarrolladas en suelos sin contaminar: sistemas Planta y Planta-Mo fue de  $1,37 \pm 0,16$  g y  $0,73 \pm 0,05$  g, respectivamente ( $p < 0,05$ ) (**Figura 3.18**). Cuando las plantas crecieron en presencia del metal (Planta-Cr; Planta-Cr-Lin; Planta-Mo-Cr y Planta-Mo-Cr-Lin) los valores de PS estuvieron comprendidos entre  $0,18 \pm 0,02$  g y  $0,28 \pm 0,03$  g. Estos valores fueron significativamente inferiores a los obtenidos en plantas desarrolladas en suelos sin contaminar ( $p < 0,05$ ). En los sistemas Planta-Lin y Planta-Mo-Lin, el PS presentó el mismo valor ( $0,43$  g).



**Figura 3.18.** Biomasa de plantas de maíz inoculadas y desarrolladas en sistemas contaminados con Cr(VI) y/o lindano luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Planta y Planta-Mo: controles bióticos. Planta-Lin; Planta-Cr; Planta-Cr-Lin; Planta-Mo-Lin; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos.

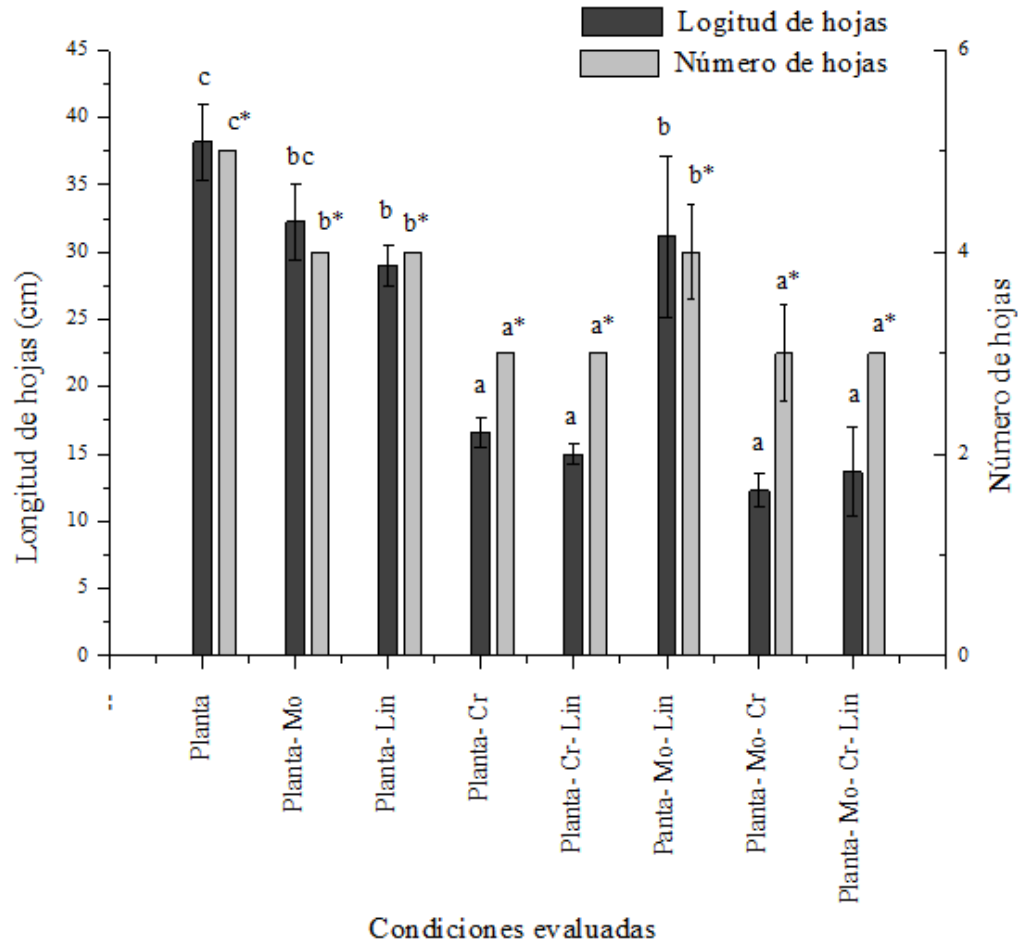
### 3.7.4.2 Número y longitud de hojas

Se evaluó el efecto de Cr(VI) y lindano sobre el crecimiento de maíz determinando el número y la longitud de las hojas. Para la determinación de ambos parámetros, se

seleccionaron las hojas que presentaron coloración verde (homogénea) y leves tonalidades amarillentas o amarronadas (no homogénea).

Las plantas que crecieron en suelo no contaminado presentaron el mayor número (5) y longitud de hojas ( $38,2 \pm 2,8$  cm) (**Figura 3.19**). En los sistemas contaminados con Cr(VI) tanto el número como la longitud de las hojas se vieron afectados negativamente con respecto a los valores obtenidos en los sistemas sin contaminar ( $p < 0,05$ ). Estas plantas desarrollaron un promedio de 3 hojas con longitudes comprendidas entre  $12,28 \pm 1,22$  cm y  $16,63 \pm 1,13$  cm ( $p > 0,05$ ) (sistemas Planta-Cr, Planta-Cr-Lin, Planta-Mo-Cr y Planta-Mo-Cr-Lin). Por su parte, la contaminación solo con lindano también condujo a la disminución del número y longitud de hojas, en comparación a las plantas que crecieron sin contaminantes y sin inóculo ( $p < 0,05$ ). En este sentido, las plantas desarrollaron un total de 4 hojas, cuyas longitudes fueron de  $29,0 \pm 1,5$  cm y  $31,1 \pm 6,0$  cm, respectivamente (sistemas Planta-Lin y Planta-Mo-Lin).





**Figura 3.19.** Longitud y número de hojas de plantas de maíz inoculadas y desarrolladas en sistemas contaminados con Cr(VI) y/o lindano luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Planta y Planta-Mo: controles bióticos. Planta-Lin; Planta-Cr; Planta-Cr-Lin; Planta-Mo-Lin; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos.

Si bien el maíz es capaz de tolerar compuestos orgánicos y metales pesados, la exposición a estos contaminantes puede tener efectos tóxicos en el crecimiento de la planta. En este estudio, la exposición de las plantas a Cr(VI) condujo a la reducción de la biomasa vegetal, longitud y número de hojas. El cromo puede interferir en los procesos fisiológicos de las plantas como la fotosíntesis, captura, transporte y asimilación de nutrientes minerales (Nagajyoti y col., 2010; Shanker y col., 2005). Además, este metal genera cambios

morfológicos como reducción en el diámetro, área superficial y cantidad de pelos radiculares (Gómez y col., 2017).

Por su parte el plaguicida, si bien ocasionó una disminución en la biomasa de las plantas, no tuvo un efecto tan nocivo como el cromo. Los compuestos orgánicos hidrofóbicos como el lindano, tienden a ser menos fitotóxicos debido a que no se acumulan fácilmente en los tejidos vegetales (Pilon-Smits, 2005).

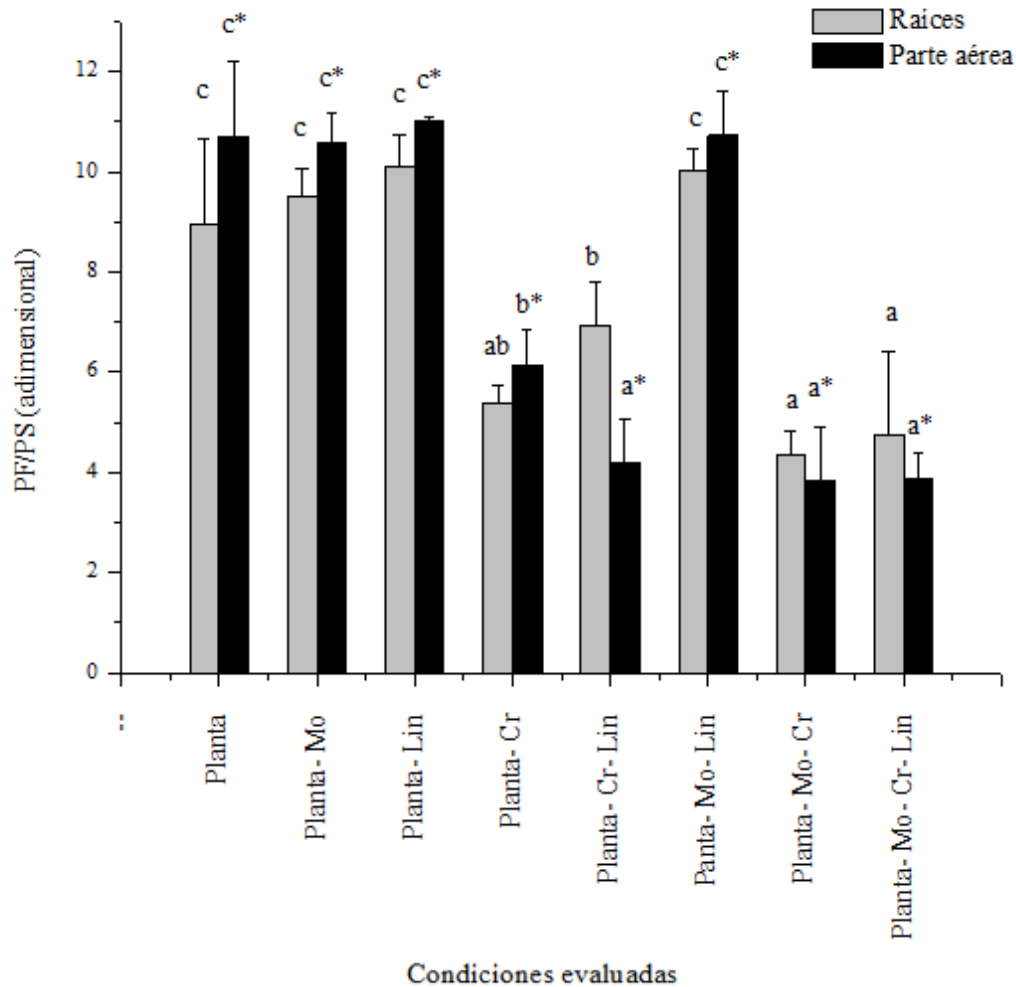
En la literatura se describen diferentes efectos de los contaminantes orgánicos e inorgánicos sobre las plantas de maíz, y en general se menciona que los mismos dependen de la naturaleza química del contaminante orgánico o del metal pesado en sí así como también de la concentración de los mismos (Polti y col., 2012; Zhang y col., 2011).

Durante el tiempo del ensayo y en las condiciones ambientales empleadas, no se observó un efecto beneficioso de *Streptomyces* sp. Z38 sobre las plantas desarrolladas en condiciones de estrés, ya que la biomasa vegetal, número y longitud de hojas no aumentaron en ninguna de las condiciones estudiadas. Se reportaron trabajos donde se observó que la inoculación de plantas con PGPB, aun en ausencia de estrés abiótico, generaba la disminución de la biomasa vegetal (Rojas y Tapia, 2012; Sziderics y col., 2007). En este sentido, bacterias del género *Streptomyces*, productoras de moléculas promotoras del crecimiento vegetal tuvieron efectos negativos sobre *Salix viminalis* y *Festuca pratensis*, por lo que los efectos positivos de las cepas pueden ser dependientes de la especie vegetal (Becerra-Castro y col., 2012). Las gramíneas son productores conocidos de fitosideróforos y por lo tanto asociarse a bacterias productoras de sideróforos, podría no ser ventajoso (Morrissey y Guerinot, 2009). Esto indicaría que las mejoras en el crecimiento vegetal no solo estarían relacionadas con las características promotoras del crecimiento de la bacteria inoculada, sino también con las características propias de la planta y el sustrato de crecimiento (Becerra y col., 2012).

### 3.7.4.3 Contenido de agua en parte aérea y raíces

La presencia de metales pesados puede inducir a un estrés hídrico en las plantas, no solo por la disminución en la captura de agua por las raíces, sino también por cambios en la conductancia estomática, la tasa de transpiración, y el contenido relativo de agua en las hojas (Domínguez y col., 2011). Para determinar el contenido de agua en las raíces y en la parte aérea de las plantas se calculó la relación entre peso fresco (PF) y peso seco (PS) (PF/PS) para cada tejido vegetal. Un mayor valor en la relación indicaba que las plantas contenían un mayor porcentaje de agua.

Los máximos valores obtenidos para esta relación correspondieron a las plantas que crecieron en los sistemas sin contaminantes y contaminados solo con lindano, independientemente de la inoculación microbiana ( $p>0,05$ ). La relación PF/PS fue menor en las raíces y parte aérea de las plantas que crecieron en presencia de Cr(VI), con relación a los sistemas controles ( $p>0,05$ ) (**Figura 3.20**). En concordancia con estos resultados, Malar y col. (2014) observaron una reducción en el contenido de agua en plántulas de *Eichhornia crassipes* cultivadas en presencia de Hg. Probablemente, la presencia de metales provoca alteraciones en la apertura y cierre de los estomas perturbando el potencial hídrico (Bashmako y col., 2005).



**Figura 3.20.** Contenido de agua en la parte aérea y raíces de plantas de maíz inoculadas y desarrolladas en sistemas contaminados con Cr(VI) y/o lindano luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$  prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Planta y Planta-Mo: controles bióticos. Planta-Lin; Planta-Cr; Planta-Cr-Lin; Planta-Mo-Lin; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos.

### 3.8 Evaluación del estrés oxidativo en las plantas

#### 3.8.1 Determinación de malondialdehído

Las plantas expuestas a plaguicidas o metales pesados forman especies reactivas de oxígeno (EROs) durante el transporte de electrones en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y glioxisomas. El incremento de las EROs genera la peroxidación lipídica de las membranas celulares resultando un claro indicador de daño oxidativo (Jiang y Zhang, 2002).

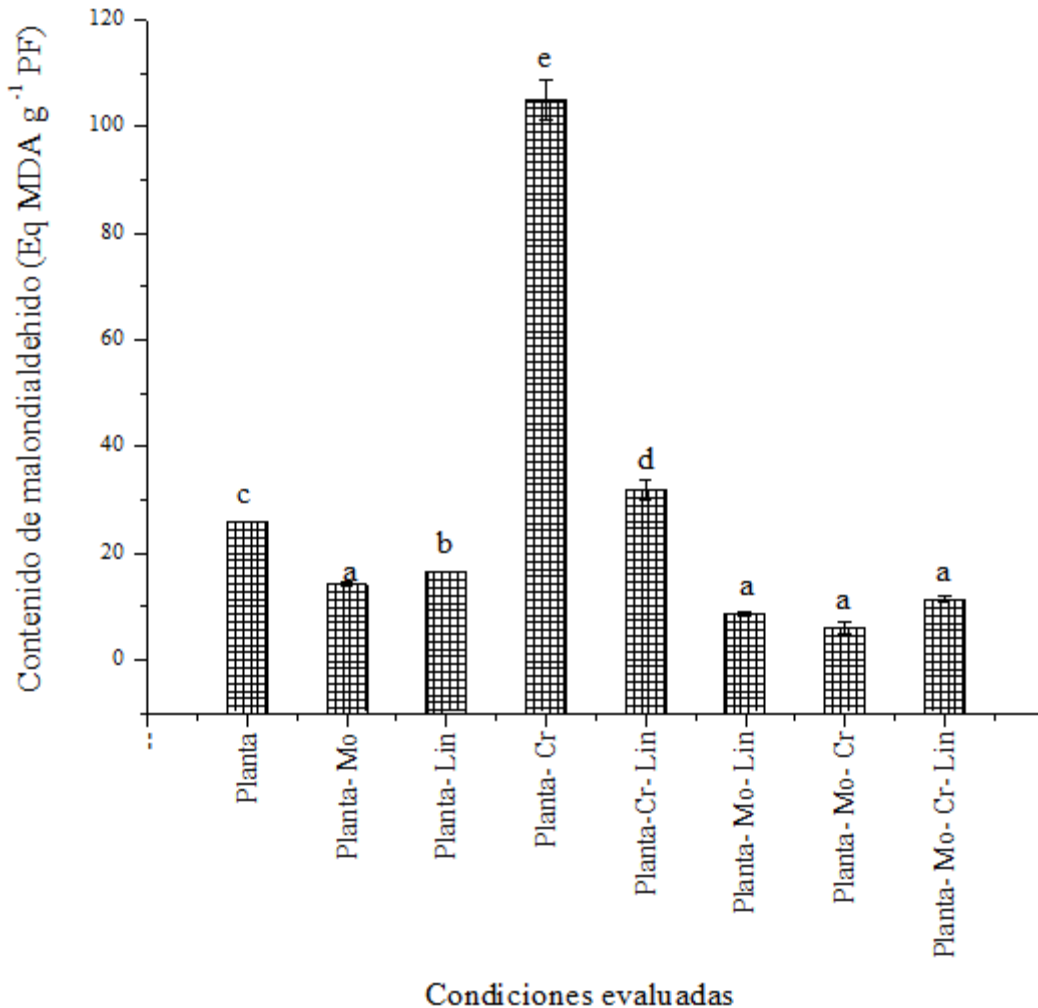
La peroxidación de los lípidos produce derivados aldehídicos secundarios, siendo el malondialdehído (MDA) el más abundante. Este compuesto, al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico, produce un compuesto coloreado que permite la detección y cuantificación de la lipoperoxidación (Prado y col., 2012).

En este trabajo se encontró que la acumulación de MDA fue más alta en las raíces de plantas no inoculadas, desarrolladas con Cr(VI) (**Figura 3.21**). El contenido de MDA en las raíces del sistema Planta-Cr fue de  $104,8 \pm 3,7$  Eq MDA g PF<sup>-1</sup>, mientras que en el sistema Planta-Cr-Lin fue de  $31,8 \pm 1,8$  Eq MDA g PF<sup>-1</sup>. Zou y col. (2009) evaluaron el contenido de MDA en las raíces y hojas de plantas de maíz al crecer en un medio contaminado con tres concentraciones de Cr(VI). Los autores informaron que la acumulación de MDA en los tejidos vegetales era mayor a medida que incrementaba la concentración de cromo en el medio de cultivo. Liu y col. (2008) expusieron resultados similares, observaron que el cromo producía daño oxidativo en la planta *Amaranthus viridis* L. En estos trabajos no se menciona la concentración del metal en los tejidos vegetales, aunque se sabe que la acumulación tisular depende de la concentración del mismo en el medio de cultivo (Gao y col., 2010).

La mayor concentración de MDA se detectó en el sistema Planta-Cr, en concordancia con la mayor concentración tisular del metal registrada en este sistema (**punto 3.6.3**) lo que permite suponer que la concentración de EROs en el tejido vegetal fue considerablemente elevada, provocando daño lipídico.

Cuando las plantas se inocularon con *Streptomyces* sp. Z38 se registró un menor contenido de MDA en presencia de Cr(VI), lo que permite suponer la activación de algún mecanismo de defensa vegetal, posiblemente activado por la bacteria. De acuerdo a Wang y

col. (2013) la presencia de bacterias estimula la actividad de enzimas antioxidantes lo que lleva a una disminución del contenido de MDA.

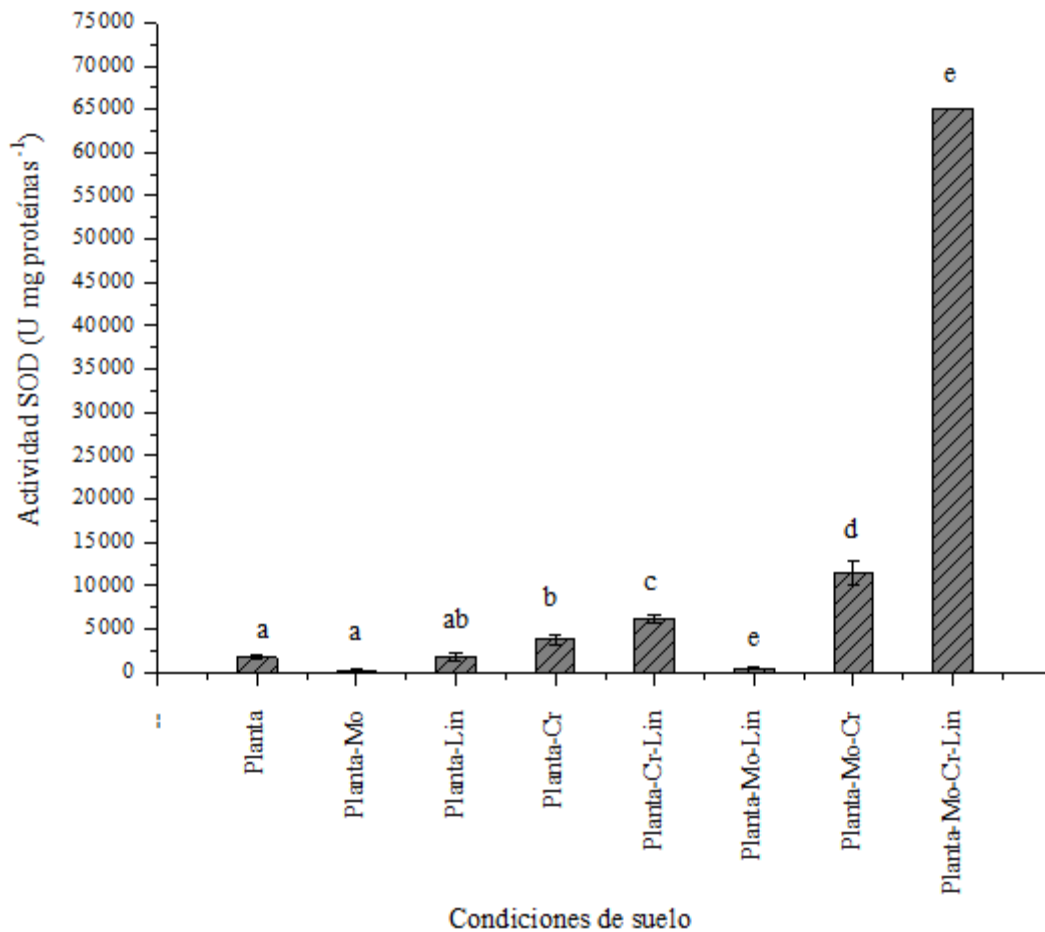


**Figura 3.21.** Contenido de malondialdehído (MDA) en las raíces de plantas de maíz inoculadas y desarrolladas en sistemas contaminados con Cr(VI) y/o lindano luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$  prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Planta y Planta-Mo: controles bióticos. Planta-Lin; Planta-Cr; Planta-Cr-Lin; Planta-Mo-Lin; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos.

### 3.8.2 Determinación de la actividad superóxido dismutasa

La actividad de una o más enzimas antioxidantes puede aumentar cuando se exponen las plantas a condiciones adversas, y la elevada actividad generalmente se correlaciona con una mayor tolerancia al ambiente. Entre las enzimas antioxidantes se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), involucrada en la dismutación del anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), formando  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot}$  (Costa y col., 2013; Peralta y col., 2011).

Se determinó la actividad SOD en las raíces de las plantas de maíz y se encontró que en presencia de Cr(VI) la actividad era significativamente mayor comparada con el control biótico. Es decir, en los sistemas Planta-Cr y Planta-Cr-Lin, ambos inoculados, la actividad SOD incrementaba significativamente (**Figura 3.22**).



**Figura 3.22.** Actividad de la enzima superóxido dismutasa en las raíces de plantas de maíz inoculadas y desarrolladas en sistemas contaminados con Cr(VI) y/o lindano luego del período de incubación (30° C, luz/oscuridad, 70% HR, 14 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$  prueba de Fisher). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Planta y Planta-Mo: controles bióticos. Planta-Lin; Planta-Cr; Planta-Cr-Lin; Planta-Mo-Lin; Planta-Mo-Cr; Planta-Mo-Cr-Lin: tratamientos biológicos.

En la literatura se describen diferentes patrones de incremento y disminución de la actividad de enzimas antioxidantes según la especie vegetal, órgano de la planta, tipo y concentración del metal, duración del estrés, edad de la planta y medio de crecimiento de la misma (Gill y Tuteja, 2010; Gratão y col., 2005). Coincidiendo con los resultados expuestos, Prado y col. (2012) observaron que en las hojas flotantes de *Salvinia minima* la actividad



SOD se incrementaba por la exposición a Cr(VI). Islam y col. (2015) demostraron que en cultivos de lenteja sembrados en suelos contaminados con cobre, aumentaba la actividad SOD cuando eran inoculados con la bacteria *Providencia vermicola*.

En este trabajo de Tesis, las plantas de maíz que no fueron inoculadas presentaron mayor actividad SOD en presencia de Cr(VI). En estas condiciones la concentración de MDA detectada fue significativamente mayor, con relación a su control, sugiriendo que las células sufrieron un daño oxidativo a nivel de lípidos. La inoculación de los sistemas contaminados con *Streptomyces* sp. Z38 cambió el panorama anteriormente mencionado. La presencia del microorganismo, incrementó significativamente la actividad SOD y se observó una disminución del contenido de MDA en las plantas. Diferentes autores sugirieron que la inoculación bacteriana activa la expresión de genes relacionados a la respuesta al estrés oxidativo causado por metales pesados (Duponnois y col., 2006; Gururani y col., 2012). Así, resulta posible suponer que *Streptomyces* sp. Z38 estimuló no solo la actividad SOD, sino todo el sistema antioxidante de la planta, lo que se reflejó en una marcada disminución del contenido de MDA.

### 3.9 Evaluación de ecotoxicidad

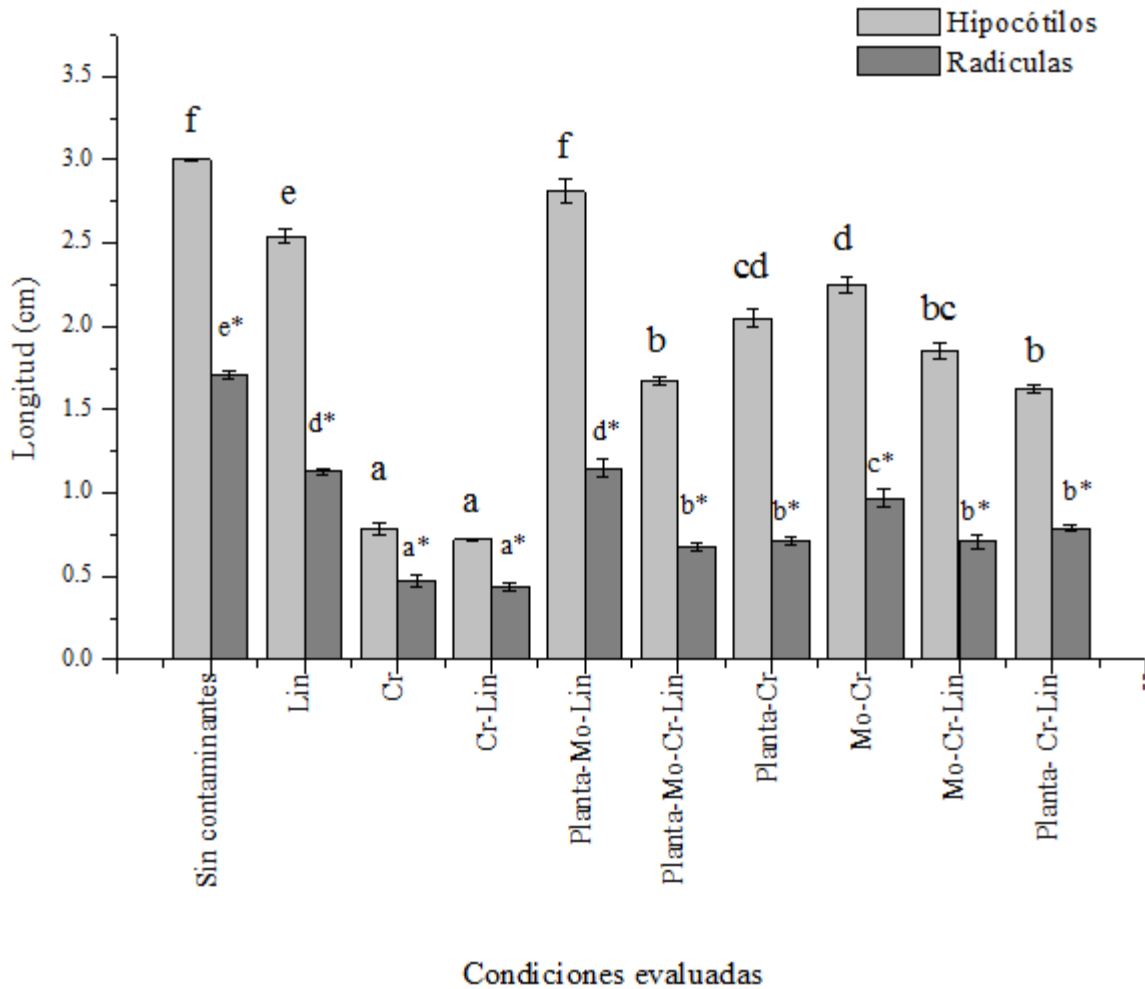
Las pruebas de ecotoxicidad empleando especies vegetales permiten determinar el efecto de los contaminantes presentes en el suelo, como así también monitorear el éxito de un proceso de remediación (Chiochetta y col., 2013). En este contexto, se realizó un bioensayo de toxicidad utilizando *Lactuca sativa* como indicador de la calidad del suelo contaminado luego de 14 días de tratamiento biológico. Dicho estudio se llevó a cabo con muestras de los sistemas tratados en los cuales se registraron las menores concentraciones residuales de Cr(VI) y lindano (**Figuras 3.23**).

Los parámetros evaluados sobre el crecimiento de las plántulas de lechuga fueron longitudes de radícula e hipocótilo.

Para corroborar la factibilidad de emplear lechuga como un buen indicador, se evaluó en primera instancia el efecto del suelo contaminado con Cr (VI) y/o lindano sobre el desarrollo de las mismas.

Se observó que las longitudes de radículas e hipocótilos fueron significativamente menores en los controles abióticos, con respecto al control sin contaminantes (**Figura 3.23**), evidenciando la toxicidad del Cr(VI) y el lindano sobre las plántulas de lechuga y demostrando por lo tanto, que es un bioindicador apropiado para el estudio del éxito del tratamiento biológico. Posada y Hernández (2007) describieron los efectos fitotóxicos de los metales pesados, los cuales inhiben la germinación y el crecimiento temprano de distintas especies vegetales. Por su parte, el lindano puede generar desequilibrio en algunos procesos bioquímicos retardando la elongación de radículas e hipocótilos (Bidlan y col., 2004; Fuentes y col., 2013; Pereira y col., 2010).

Varios trabajos informaron que el tratamiento biológico de un contaminante, a veces puede ser acompañado por la transformación del compuesto original en metabolitos más tóxicos que podrían persistir en el suelo y producir toxicidad en ciertas especies (Fuentes y col., 2013; Pereira y col., 2010; Sáez y col., 2014). En este trabajo se encontró que las plantas de lechuga que crecieron en los sistemas biorremediados, desarrollaron hipocótilos y radículas con longitudes significativamente mayores con relación a los controles abióticos (**Figura 3.23**). Esto indicaría que durante el tratamiento biológico de los suelos contaminados con Cr(VI) y/o lindano, con *Streptomyces* sp. Z38 y/o las plantas de maíz, no se habrían producido metabolitos de degradación o especies metálicas más tóxicas que los compuestos parentales.



**Figura 3.23.** Longitud de los hipocótilos y radículas de plántulas de lechuga desarrolladas en los suelos tratados biológicamente (25° C, 70% HR, 5 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Lin: lindano; Cr: Cr(VI); Mo: microorganismo. Sin contaminantes: control biótico. Lin; Cr(VI); Cr(VI)-Lin: controles abióticos. Planta-Mo-Lin; Planta-Mo-Cr-Lin; Planta-Cr; Mo-Cr; Mo-Cr-Lin; Planta-Cr-Lin: muestras de suelo tratadas biológicamente.

# CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, permitieron formular las siguientes conclusiones:

- Se determinó la presencia de plaguicidas organoclorados y metales pesados en muestras de suelo adyacentes a un antiguo depósito clandestino de plaguicidas, sito en la localidad de Argentina, Santiago del Estero.
- Se aislaron 57 colonias bacterianas con características compatibles con actinobacterias del género *Streptomyces*, a partir de muestras de suelo libre de vegetación, rizósfera y plantas crecidas en sitios circundantes al antiguo depósito de plaguicidas.
- Se seleccionaron cinco actinobacterias en virtud de su crecimiento en presencia de Cr(VI) y lindano en medio sólido artificialmente contaminado. Las cepas denominadas ZF, ZI (suelo), Z2, Z38 (rizósfera) y ZII (planta), se identificaron mediante secuenciación del ADNr 16S como miembros del género *Streptomyces*.
- Entre las cepas estudiadas, *Streptomyces* sp. Z38 y *Streptomyces* sp. Z2 presentaron un mayor número de características promotoras del crecimiento vegetal tales como producción de sideróforos, solubilización de fosfato inorgánico, producción de ácido indoacético y actividad ACC desaminasa.
- Se seleccionaron *Streptomyces* sp. Z2 y *Streptomyces* sp. Z38 debido a que presentaron los máximos valores de remoción de Cr(VI) y lindano en medio de cultivo líquido co-contaminado.
- En presencia de exudados radiculares de plantas de maíz, *Streptomyces* sp. Z2 y *Streptomyces* sp. Z38 presentaron valores de remoción de Cr(VI) significativamente superiores a los obtenidos en medio líquido con glucosa.

- La remoción de lindano por *Streptomyces* sp. Z2 y *Streptomyces* sp. Z38 en presencia de exudados radiculares de plantas de maíz, no se vio afectada al aumentar la concentración del plaguicida.
- En el bioensayo en suelo, la mayor remoción de Cr(VI) se obtuvo en los sistemas maíz-contaminantes y *Streptomyces* sp. Z38-contaminantes, mientras que la mayor remoción de lindano se obtuvo en el sistema maíz-*Streptomyces* sp. Z38-contaminantes.
- *Streptomyces* sp. Z38 estimuló el sistema antioxidante de las plantas de maíz en presencia de Cr(VI), lo que se evidenció en un incremento de la actividad superóxido dismutasa y en la marcada disminución del contenido de malondialdehído.
- El desarrollo de las plántulas de *Lactuca sativa* utilizadas como bioindicadores de la calidad del suelo al final del proceso, demostró la efectividad de los procesos de bio/fitorremediación empleados.

**Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis permiten confirmar la hipótesis de trabajo inicialmente establecida. En este sentido, se encontró que el sistema planta de maíz- *Streptomyces* sp. Z38 es una metodología útil para tratar suelos co-contaminados con Cr(VI) y lindano.**

**El conocimiento alcanzado a partir del análisis de los resultados obtenidos en este trabajo, proveen las bases para entender mejor las interacciones entre actinobacterias, plantas y contaminantes, permitiendo optimizar las técnicas de bio/fitorremediación de sistemas co-contaminados con plaguicidas organoclorados y metales pesados en futuros ensayos a mayor escala.**

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adegboye, M.F., Babalola, O.O. (2012). Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *African Journal of Agricultural Research*.7: 2255-2261.
- Adriano, D.C. (2001). Trace elements in terrestrial environments: Biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals. Springer. Nueva York, Estados Unidos
- Aguilar-Piedras, J.J., Xiqui-Vásquez, M.L., García-García, S., Baca, B.E. (2008). Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 50: 29-37.
- Albarracín, V.H., Winik, B., Kothe, E., Amoroso, M.J., Abate, C.M. (2008). Copper bioaccumulation by the actinobacterium *Amycolatopsis* sp. AB0. *Journal of Basic Microbiology*. 48: 323-330.
- Alexander, M. (2000). Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science and Technology*. 34: 4259-4265.
- Álvarez, A., Benimeli, C., Saez, J., Fuentes, M., Cuozzo, S., Polti, M., Amoroso, M. (2012). Bacterial bio-resources for remediation of hexachlorocyclohexane. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 15086-15106.
- Álvarez, A., Benimeli, C.S., Sáez, J.M., Giuliano, A., Amoroso, M.J. (2015). Lindane removal using *Streptomyces* strains and maize plants: a biological system for reducing pesticides in soils. *Plant and Soil*. 395: 401-413.
- Álvarez, A., Catalano, S.A., Amoroso, M.J. (2013). Heavy metal resistant strains are widespread along *Streptomyces* phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 66: 1083-1088.
- Álvarez, A., Saez, J.M., Costa, J.S.D., Colin, V.L., Fuentes, M.S., Cuozzo, S.A., Amoroso, M.J. (2017). Actinobacteria: current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere*. 166: 41-62.
- Ameur, H. (2012). Screening of actinomycetes producing antibacterial substances and indole acetic acid IAA and optimization of growth and IAA production conditions in *Streptomyces* sp SF5. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive*. 3.
- Amin, A.S., Kassem, M.A. (2012). Chromium speciation in environmental samples using a solid phase spectrophotometric method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 96: 541-547.



- Amoroso, M.J., Castro, G.R., Carlino, F.J., Romero, N.C., Hill, R.T., Oliver, G. (1998). Screening of heavy metal-tolerant actinomycetes isolated from the Sali River. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 44: 129-132.
- Amoroso, M.J., Castro, G.R., Durán, A., Peraud, O., Oliver, G., Hill, R.T. (2001). Chromium accumulation by two *Streptomyces* spp. isolated from riverine sediments. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 26: 210-215.
- Amoroso, M.J., Schubert, D., Mitscherlich, P., Schumann, P., Kothe, E. (2000). Evidence for high affinity nickel transporter genes in heavy metal resistant *Streptomyces* spec. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*. 40: 295-301.
- Amoroso, M.J., Tracanna, B.C. (1997). Estudio de la carga orgánica y bacteriana en el embalse Río Hondo (Tucumán y Santiago del Estero, Argentina). *Fundación Miguel Lillo*. 103
- Aparicio, J. (2018). Biorremediación de suelos contaminados con Cr(VI) y lindano por actinobacterias. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina.
- Aparicio, J., Solá, M.Z.S., Benimeli, C.S., Amoroso, M.J., Polti, M.A. (2015). Versatility of *Streptomyces* sp. M7 to bioremediate soils co-contaminated with Cr(VI) and lindane. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 116: 34-39.
- Arias Verdes, J.A, Riera Betancourt, C., Rojas Companioni, D., Cabrera Cruz, N., Dierkmeier Corcuela, G. (1992). Plaguicidas organoclorados. Centro de ecología humana y salud. Serie Vigilancia. Organización panamericana de la salud/Organización Mundial de la Salud. Metepec, Mexico.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*. 141: 391-396.
- Ashraf, A., Bibi, I., Niazi, N.K., Ok, Y.S., Murtaza, G., Shahid, M., Mahmood, T. (2017). Chromium (VI) sorption efficiency of acid-activated banana peel over organo-montmorillonite in aqueous solutions. *International Journal of Phytoremediation*. 19: 605-613.

- Atlas, R.M., Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson-Addison Wesley.
- ATSDR (2011). Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Hexachlorocyclohexane (HCH). <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/TP.asp?id=754&tid=138>
- Avudainayagam, S., Megharaj, M., Owens, G., Kookana, R.S., Chittleborough, D., Naidu, R. (2003). Chemistry of chromium in soils with emphasis on tannery waste sites. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 53-91). Springer, New York, NY.
- Babula, P., Adam, V., Opatrilova, R., Zehnalek, J., Havel, L., Kizek, R. (2009). Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. In *Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants* (pp. 275-317). Springer, Dordrecht.
- Bagchi, D., Stohs, S.J., Downs, B.W., Bagchi, M., Preuss, H. G. (2002). Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology*. 180: 5-22.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 233-266.
- Barra, R., Colombo, J.C., Eguren, G., Gamboa, N., Jardim, W.F., Mendoza, G. (2006). Persistent organic pollutants (POPs) in eastern and western South American countries. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 1-33). Springer, New York, NY.
- Bashmakov, D.I., Lukatkin, A.S., Revin, V.V., Duchovskis, P., Brazaitytė, A., Baranauskis, K. (2005). Growth of maize seedlings affected by different concentrations of heavy metals. *Ekologija*. 3: 22-27.
- Beattie, G.A. (2007). Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In *Plant-Associated Bacteria* (pp. 1-56). Springer, Dordrecht.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*. 44: 276-287.
- Becerra-Castro, C., Kidd, P.S., Rodríguez-Garrido, B., Monterroso, C., Santos-Ucha, P., Prieto-Fernández, Á. (2013a). Phytoremediation of hexachlorocyclohexane

- (HCH)-contaminated soils using *Cytisus striatus* and bacterial inoculants in soils with distinct organic matter content. *Environmental Pollution*. 178: 202-210.
- Becerra-Castro, C., Monterroso, C., Prieto-Fernández, A., Rodríguez-Lamas, L., Loureiro-Viñas, M., Acea, M.J., Kidd, P.S. (2012). *Pseudometallophytes* colonising Pb/Zn mine tailings: a description of the plant-microorganism-rhizosphere soil system and isolation of metal-tolerant bacteria. *Journal of Hazardous Materials* 217: 350-359.
- Becerra-Castro, C., Prieto-Fernández, A., Kidd, P.S., Weyens, N., Rodríguez-Garrido, B., Touceda-González, M., Vangronsveld, J. (2013b). Improving performance of *Cytisus striatus* on substrates contaminated with hexachlorocyclohexane (HCH) isomers using bacterial inoculants: developing a phytoremediation strategy. *Plant and Soil*. 362: 247-260.
- Benimeli, C.S. (2004). Biodegradación de plaguicidas organoclorados por actinobacterias acuáticas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina.
- Benimeli, C.S., Amoroso, M.J., Chaile, A.P., Castro, G.R. (2003). Isolation of four aquatic *Streptomyces* strains capable of growth on organochlorine pesticides. *Bioresource Technology*. 89: 133-138.
- Benimeli, C.S., Castro, G.R., Chaile, A.P., Amoroso, M.J. (2007). Lindane uptake and degradation by aquatic *Streptomyces* sp. strain M7. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 59: 148-155.
- Bidlan, R., Afsar, M., Manonmani, H.K. (2004). Bioremediation of HCH-contaminated soil: elimination of inhibitory effects of the insecticide on radish and green gram seed germination. *Chemosphere*. 56: 803-811.
- Blondel, C., Khelalfa, F., Reynaud, S., Fauvelle, F., Raveton, M. (2016). Effect of organochlorine pesticides exposure on the maize root metabolome assessed using high-resolution magic-angle spinning 1H NMR spectroscopy. *Environmental Pollution*. 214: 539-548.
- Böltner, D., Godoy, P., Muñoz-Rojas, J., Duque, E., Moreno-Morillas, S., Sánchez, L., Ramos, J.L. (2008). Rhizoremediation of lindane by root-colonizing *Sphingomonas*. *Microbial Biotechnology*. 1: 87-93.

- Bouyoucos, G. J. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils 1. *Agronomy journal*. 54: 464-465.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Bradl, H. (2005). *Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation*. Elsevier.
- Bradstreet, R. B. (1954). Kjeldahl method for organic nitrogen. *Analytical Chemistry*. 26: 185-187.
- Brunetti, G., Farrag, K., Rovira, P.S., Nigro, F., Senesi, N. (2011). Greenhouse and field studies on Cr, Cu, Pb and Zn phytoextraction by *Brassica napus* from contaminated soils in the Apulia region, Southern Italy. *Geoderma*. 160: 517-523.
- Burd, G.I., Dixon, D.G., y Glick, B.R. (2000). Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology*. 46: 237-245.
- Butera, S., Trapp, S., Astrup, T.F., Christensen, T.H. (2015). Soil retention of hexavalent chromium released from construction and demolition waste in a road-base-application scenario. *Journal of Hazardous Materials*. 298: 361-367.
- Caicedo, P., Schröder, A., Ulrich, N., Schröter, U., Paschke, A., Schüürmann, G., Richter, P. (2011). Determination of lindane leachability in soil-biosolid systems and its bioavailability in wheat plants. *Chemosphere*. 84: 397-402.
- Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G.A., Uad, I., González-López, J. (2009). Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Science of the Total Environment*. 407: 3634-3640.
- Chaile, A.P., Romero, N., Amoroso, M.J. (2008). Agroquímicos organoclorados en un embalse del NOA Argentina. V Congreso Iberoamericano de Física y Química Ambiental. Mar del Plata, Argentina.
- Chaile, A.P., Romero, N, Amoroso, M.J., Hidalgo M.V., Apella, M.C. (1999). Organochlorine pesticides in Sali River, Tucumán-Argentina. *Revista Boliviana de Ecología*. 6: 203-209.

- Chaile, A.P., Romero, N., Hidalgo, M.V., Amoroso, M.J. (2007). Presencia de plaguicidas organoclorados en ríos de la principal cuenca hidrológica de la provincia de Tucumán-Argentina. V Congreso de Medio Ambiente AUGM. La Plata, Argentina.
- Chen, H., Arocena, J.M., Li, J., Thring, R.W., Zhou, J. (2014). Assessments of chromium (and other metals) in vegetables and potential bio-accumulations in humans living in areas affected by tannery wastes. *Chemosphere*. 112: 412-419.
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*. 33: 745-755.
- Chen, T., Chang, Q., Liu, J., Clevers, J.G.P.W., Kooistra, L. (2016). Identification of soil heavy metal sources and improvement in spatial mapping based on soil spectral information: a case study in northwest China. *Science of the Total Environment*. 565: 155-164.
- Chen, Y., Li, X., Shen, Z. (2004). Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextraction process. *Chemosphere*. 57: 187-196.
- Chigbo, C., Batty, L., Bartlett, R. (2013). Interactions of copper and pyrene on phytoremediation potential of *Brassica juncea* in copper-pyrene co-contaminated soil. *Chemosphere*. 90: 2542-2548.
- Chiochetta, C.G., Radetski, M.R., Corrêa, A.X., Tischer, V., Tiepo, E.N., Radetski, C.M. (2013). Abandoned coal mining sites: using ecotoxicological tests to support an industrial organic sludge amendment. *Environmental Science and Pollution Research*. 20: 7656-7665.
- Choppala, G., Kunhikrishnan, A., Seshadri, B., Park, J.H., Bush, R., Bolan, N. (2018). Comparative sorption of chromium species as influenced by pH, surface charge and organic matter content in contaminated soils. *Journal of Geochemical Exploration*. 184: 255-260.

- Choudhury, S., Panda, S.K. (2005). Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) broth. under chromium and lead phytotoxicity. *Water, Air, and Soil Pollution*. 167: 73-90.
- Colin, V.L., Baigorí, M.D., Pera, L.M. (2010). Bioemulsifier production by *Aspergillus niger* MYA 135: presumptive role of iron and phosphate on emulsifying ability. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26:2291-2295.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E.A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 4951-4959.
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 53: 224-229.
- Corredor, B.B., Mesa, G.P., Gallo, S.A. C., Pino, N. (2013). Biorremediación de suelo contaminado con pesticidas: caso DDT. *Gestión y Ambiente*. 16: 119-135.
- Costa, J.S.D., Kothe, E., Amoroso, M.J., Abate, C.M. (2013). Overview of copper resistance and oxidative stress response in *Amycolatopsis tucumanensis*, a useful strain for bioremediation. *Actinobacteria: Application in Bioremediation and Production of Industrial Enzymes*. 74.
- Crowley, D.E. (2006). Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In *Iron Nutrition In Plants And Rhizospheric Microorganisms* (pp. 169-198). Springer, Dordrecht.
- Csillag, J., Pártay, G., Lukács, A., Bujtás, K., Németh, T. (1999). Extraction of soil solution for environmental analysis. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 74: 305-324.
- Curl, E.A., Truelove, B. (1996). The rhizosphere. Springer-Verlag, Berlin.
- da Conceicao Gomes, M.A., Hauser-Davis, R.A., Suzuki, M.S., Vitoria, A.P. (2017). Plant chromium uptake and transport, physiological effects and recent advances in molecular investigations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 140: 55-64.
- De-la-Peña, C., Lei, Z., Watson, B.S., Sumner, L.W., Vivanco, J.M. (2008). Root-microbe communication through protein secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 283: 25247-25255.

- Deng, B., Lan, L., Houston, K., Brady, P.V. (2003). Effects of clay minerals on Cr(VI) reduction by organic compounds. *Environmental Monitoring and Assessment*. 84: 5-18.
- Derz, K., Bernhardt, C., Hennecke, D., Koerdel, W. (2012). Ansätze zur Bewertung der Verfügbarkeit von Schadstoffen im nachsorgenden Bodenschutz-Teil II: Verfügbarkeit fuer Stofftransport und Abbauprozesse in Boeden. *Bodenschutz*. 4: 108-112.
- Desaules, A. (2012). Critical evaluation of soil contamination assessment methods for trace metals. *Science of the Total Environment*. 426: 120-131.
- Dickinson, N.M., Baker, A.J., Doronila, A., Laidlaw, S., Reeves, R.D. (2009). Phytoremediation of inorganics: realism and synergies. *International Journal of Phytoremediation*. 11: 97-114.
- Dimkpa, C.O., Merten, D., Svatoš, A., Büchel, G., Kothe, E. (2009). Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *Journal of Applied Microbiology*. 107: 1687-1696.
- Domínguez, M.T., Marañón, T., Murillo, J.M., Redondo-Gómez, S. (2011). Response of Holm oak (*Quercus ilex subsp. ballota*) and mastic shrub (*Pistacia lentiscus L.*) seedlings to high concentrations of Cd and Tl in the rhizosphere. *Chemosphere*. 83: 1166-1174.
- Dong, Z.Y., Huang, W.H., Xing, D.F., Zhang, H.F. (2013). Remediation of soil co-contaminated with petroleum and heavy metals by the integration of electrokinetics and biostimulation. *Journal of Hazardous Materials*. 260: 399-408.
- Du, Z., Bramlage, W.J. (1992). Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 1566-1570.
- Duponnois, R., Kisa, M., Assigbetse, K., Prin, Y., Thioulouse, J., Issartel, M., Lepage, M. (2006). Fluorescent pseudomonads occurring in *Macrotermes subhyalinus* mound structures decrease Cd toxicity and improve its accumulation in sorghum plants. *Science of the Total Environment*. 370: 391-400.



- Economou-Eliopoulos, M., Megremi, I., Atsarou, C., Theodoratou, C., Vasilatos, C. (2013). Spatial evolution of the chromium contamination in soils from the Assopos to Thiva Basin and C. Evia (Greece) and potential source (s): Anthropogenic versus natural processes. *Geosciences*. 3: 140-158
- Ensign, J.C. (1978). Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annual Reviews in Microbiology*. 32: 185-219.
- Fedotov, P.S., Kördel, W., Miró, M., Peijnenburg, W.J., Wennrich, R., Huang, P.M. (2012). Extraction and fractionation methods for exposure assessment of trace metals, metalloids, and hazardous organic compounds in terrestrial environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 42: 1117-1171.
- Fellet, G., Marchiol, L., Perosa, D., Zerbi, G. (2007). The application of phytoremediation technology in a soil contaminated by pyrite cinders. *Ecological Engineering*. 31: 207-214.
- Flora, S.J. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2: 191-206.
- Fuentes, M.S., Benimeli, C.S., Cuozzo, S.A., Amoroso, M.J. (2010). Isolation of pesticide-degrading actinomycetes from a contaminated site: bacterial growth, removal and dechlorination of organochlorine pesticides. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 64: 434-441.
- Fuentes, M.S., Sáez, J.M., Benimeli, C.S., Amoroso, M.J. (2011). Lindane biodegradation by defined consortia of indigenous *Streptomyces* strains. *Water, Air, y Soil Pollution*. 222: 217-231.
- Gadd, G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*. 156: 609-643.
- Gagneten, A.M. (2002). Respuesta de una comunidad zooplanctónica de agua dulce a la aplicación de cromo en clausuras experimentales. *Interciencia*. 27: 563-570.
- Gagneten, A.M., Ceresoli, N. (2004). Efectos del efluente de curtiembre sobre la abundancia y riqueza de especies del zooplancton en el Arroyo Las Prusianas (Santa Fe, Argentina). *Interciencia*. 29: 702-708.



- Gallios, G.P., Vaclavikova, M. (2008). Removal of chromium(VI) from water streams: a thermodynamic study. *Environmental Chemistry Letters*. 6: 235-240.
- Gao, S., Ou-yang, C., Tang, L., Zhu, J.Q., Xu, Y., Wang, S.H., Chen, F. (2010). Growth and antioxidant responses in *Jatropha curcas* seedling exposed to mercury toxicity. *Journal of Hazardous Materials*. 182: 591-597.
- Garbisu, C., Alkorta, I. (2001). Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource technology*. 77: 229-236.
- Ghai, R., McMahon, K.D., Rodriguez-Valera, F. (2012). Breaking a paradigm: cosmopolitan and abundant freshwater actinobacteria are low GC. *Environmental Microbiology Reports*. 4: 29-35.
- Ghanem, N.B., Sabry, S.A., El-Sherif, Z.M., El-Ela, G.A.A. (2000). Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 46: 105-111.
- Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S.K., Joner, E. (2005). Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*. 12: 34-48.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*. 59: 309-314.
- Gill, S.S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48: 909-930.
- Glick, B.R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 41: 109-117.
- Glick, B.R., Penrose, D.M., Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*. 190: 63-68.
- Glick, B.R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., McConkey, B. (2007). Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 26: 227-242.

- Gómez García, A., Garns, P.M. (2004). Papel del cromo y del cinc en el metabolismo de la insulina. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*. 42: 342-352.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W., Whitman, W.B. (2012). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer. Nueva York, Estados Unidos.
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J., Azevedo, R.A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*. 32: 481-494.
- Gururani, M.A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C.P., Nookaraju, A., Pandey, S.K., Park, S.W. (2012). Plant disease resistance genes: current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 78: 51-65.
- .
- Hamedi, J., Mohammadipanah, F. (2015). Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 42: 157-171.
- Hammer, D., Kayser, A., Keller, C. (2003). Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix viminalis* in field trials. *Soil Use and Management*. 19: 187-192.
- Hanlon, E. A., Johnson, G. V. 1984. Bray/Kurtz, Mehlich III, AB/D and ammonium acetate extractions of P, K and Mg in four Oklahoma soils. *Communications in soil science and plant analysis*. 15: 277-294.
- Hasegawa, S., Meguro, A., Shimizu, M., Nishimura, T., Kunoh, H. (2006). Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. *Actinomycetologica*. 20: 72-81.
- Hausladen, D.M., Fendorf, S. (2017). Hexavalent chromium generation within naturally structured soils and sediments. *Environmental Science and Technology*. 51: 2058-2067.
- He, Z.L., Yang, X.E. (2007). Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University Science B*. 8: 192-207.
- Hechmi, N., Aissa, N.B., Abdenaceur, H., Jedidi, N. (2014). Evaluating the phytoremediation potential of *Phragmites australis* grown in pentachlorophenol and cadmium co-

- contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*. 21: 1304-1313.
- Herter, U., Kuelling, D. (2001). Risikoanalyse zur Abfallduengerverwertung in der Landwirtschaft-Teil 1: Grobbeurteilung. Bericht der Eidgenoessische Forschungsanstalt fuer Agraroeekologie und Landbau FAL. Zuerich-Reckenholz.
- Hider, R.C., Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural product reports*. 27: 637-657.
- Hiltner, L. (1904). Uber nevere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Boden Bakteriologie und unter besonderer Beurchsichtigung der Grundung und Broche. *Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft Arb*. 98: 59-78.
- Hoagland, D.R. (1937). Some aspects of the salt nutrition of higher plants. *The Botanical Review*. 3: 307-334
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., Schrempf, H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. Londres, Reino Unido. John Innes Foundation.
- Hsu, L.C., Liu, Y.T., Tzou, Y.M. (2015). Comparison of the spectroscopic speciation and chemical fractionation of chromium in contaminated paddy soils. *Journal of Hazardous Materials*. 296: 230-238.
- IARC (1987). International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Supplement 7, Volumen 49.
- IARC (2015). International Agency for Research on Cancer. Monographs Evaluate DDT, lindane, and 2,4-D. Press release N° 236. 23 June 2015. Lyon, France.
- Irizar, A., Duarte, D., Guilhermino, L., Marigómez, I., Soto, M. (2014). Optimization of NRU assay in primary cultures of *Eisenia fetida* for metal toxicity assessment. *Ecotoxicology*. 23: 1326-1335.
- Islam, F., Yasmeen, T., Ali, Q., Mubin, M., Ali, S., Arif, M.S., Abbas, F. (2016). Copper-resistant bacteria reduce oxidative stress and uptake of copper in lentil plants: potential for bacterial bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*. 23: 220-233.

- ISO 17402 (2008). Soil quality-requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials.
- Jadia, C.D., Fulekar, M.H. (2008). Phytotoxicity and remediation of heavy metals by fibrous root grass (sorghum). *Journal of Applied Biosciences*. 10: 491-499.
- Jiang, M., Zhang, J. (2002). Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*. 53: 2401-2410.
- Kämpfer, P., Kroppenstedt, R.M. (1991). Probabilistic identification of streptomycetes using miniaturized physiological tests. *Microbiology*. 137: 1893-1902.
- Khadraji, A., Mouradi, M., Bassour, H., Ghoulam, C. (2017). Phosphate solubilization capacity, salinity and drought tolerance of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Moroccan Journal of Chemistry*. 5: 722-729.
- Khan, A.L., Hamayun, M., Radhakrishnan, R., Waqas, M., Kang, S.M., Kim, Y.H., Lee, I.J. (2012). Mutualistic association of *Paecilomyces formosus* LHL10 offers thermotolerance to *Cucumis sativus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 101: 267-279.
- Kidd, P.S., Domínguez-Rodríguez, M.J., Díez, J., Monterroso, C. (2007). Bioavailability and plant accumulation of heavy metals and phosphorus in agricultural soils amended by long-term application of sewage sludge. *Chemosphere*. 66: 1458-1467
- Kidd, P. S., Prieto-Fernández, A., Monterroso, C., Acea, M.J. (2008). Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant and Soil*. 302: 233-247.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Charter, K.F., Hopwood, D.A., Centre, J.I. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation. Norwich, Reino Unido.
- Kim, K.R., Owens, G., Naidu, R., Kim, K.H. (2007). Assessment techniques of heavy metal bioavailability in soil: A critical review. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*. 40: 311-325.

- Kim, R.Y., Yoon, J.K., Kim, T.S., Yang, J.E., Owens, G., Kim, K.R. (2015). Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation -a critical review. *Environmental Geochemistry and Health*. 37: 1041-1061
- Krämer, U. (2005). Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology*. 16: 133-141.
- Kuiper, I., Legendijk, E.L., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J. (2004). Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17: 6-15.
- Kwon, S.I., Jang, Y.A., Owens, G., Kim, M.K., Jung, G.B., Hong, S.C., Kim, K.R. (2014). Long-term assessment of the environmental fate of heavy metals in agricultural soil after cessation of organic waste treatments. *Environmental Geochemistry and Health*. 36: 409-419.
- Lal, R., Pandey, G., Sharma, P., Kumari, K., Malhotra, S., Pandey, R., Oakeshott, J. G. (2010). Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74: 58-80.
- Lamont, B.B. (2003). Structure, ecology and physiology of root clusters -a review. *Plant and Soil*. 248: 1-19.
- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N. (2004). The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 57: 39-47.
- Lechevalier, H.A. (1989). A practical guide to generic identification of actinomycetes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 2344-2347). Williams and Wilkins. Baltimore, Maryland.
- Lemanceau, P., Maurhofer, M., Défago, G. (2007). Contribution of studies on suppressive soils to the identification of bacterial biocontrol agents and to the knowledge of their modes of action. In *Plant-Associated Bacteria* (pp. 231-267). Springer. Dordrecht.
- Lin, Q., Shen, K.L., Zhao, H.M., Li, W.H. (2008). Growth response of *Zea mays* L. in pyrene-copper co-contaminated soil and the fate of pollutants. *Journal of Hazardous Materials*. 150: 515-521.

- Liu, D., Zou, J., Wang, M., y Jiang, W. (2008). Hexavalent chromium uptake and its effects on mineral uptake, antioxidant defence system and photosynthesis in *Amaranthus viridis* L. *Bioresource Technology*. 99: 2628-2636.
- Liu, N., Jørgensen, U., Lærke, P.E. (2013). Quality determination of biomass for combustion: a new high-throughput microwave digestion method prior to elemental analysis by inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy. *Energy and Fuels*. 27: 7485-7488.
- Louvel, B., Cébron, A., Leyval, C. (2011). Root exudates affect phenanthrene biodegradation, bacterial community and functional gene expression in sand microcosms. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65: 947-953.
- Lovley, D.R. (1995). Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction. *Journal of Industrial Microbiology*. 14: 85-93.
- Lu, A., Zhang, S., Shan, X.Q. (2005). Time effect on the fractionation of heavy metals in soils. *Geoderma*. 125: 225-234.
- Luo, C., Shen, Z., Li, X. (2005). Enhanced phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS. *Chemosphere*, 59: 1-11.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Freitas, H. (2009). Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. *Chemosphere*: 75: 719-725.
- Malar, S., Sahi, S.V., Favas, P.J., Venkatachalam, P. (2015). Mercury heavy-metal-induced physiochemical changes and genotoxic alterations in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. *Environmental Science and Pollution Research*. 22: 4597-4608.
- Mansour, S.A., Belal, M.H., Abou-Arab, A.A., Gad, M.F. (2009). Monitoring of pesticides and heavy metals in cucumber fruits produced from different farming systems. *Chemosphere*. 75: 601-609.
- Martí, E., Sierra, J., Cáliz, J., Montserrat, G., Vila, X., Garau, M.A., Cruañas, R. (2013). Ecotoxicity of Cr, Cd, and Pb on two mediterranean soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 64: 377-387.

- Mayfield, C.I., Williams, S.T., Ruddick, S.M., Hatfield, H.L. (1972). Studies on the ecology of actinomycetes in soil IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 4: 79-91.
- McGrath, S.P., Zhao, F.J., Lombi, E. (2001). Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and Soil*. 232: 207-214.
- Moreira, I.S., Amorim, C.L., Carvalho, M.F., Ferreira, A.C., Afonso, C.M., Castro, P.M. (2013). Effect of the metals iron, copper and silver on fluorobenzene biodegradation by *Labrys portucalensis*. *Biodegradation*. 24: 245-255.
- Morrissey, J., Guerinot, M.L. (2009). Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chemical Reviews*. 109: 4553-4567.
- Mulligan, C.N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*. 133: 183-198.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 8: 199-216.
- Nardi, S., Sessi, E., Pizzeghello, D., Sturaro, A., Rella, R., Parvoli, G. (2002). Biological activity of soil organic matter mobilized by root exudates. *Chemosphere*. 46: 1075-1081.
- Neubauer, U., Furrer, G., Schulin, R. (2002). Heavy metal sorption on soil minerals affected by the siderophore desferrioxamine B: the role of Fe(III) (hydr) oxides and dissolved Fe(III). *European Journal of Soil Science*. 53: 45-55.
- NRC Committee (2003). National Research Council Committee on bioavailability of contaminants in soils and sediments. Bioavailability of contaminants in soils and sediments: Processes, tools, and applications. The National Academic Press. Washington DC, Estados Unidos.
- Okeke, B.C., Siddique, T., Arbestain, M.C., Frankenberger, W.T. (2002). Biodegradation of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane (lindane) and  $\alpha$ -hexachlorocyclohexane in water and a soil slurry by a *Pandora* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 2548-2555.
- Olaniran, A., Balgobind, A., Pillay, B. (2013). Bioavailability of heavy metals in soil: impact on microbial biodegradation of organic compounds and possible improvement strategies. *International Journal of Molecular Sciences*. 14: 10197-10228.



- Oliveros-Bastidas, A.D.J., Macías, F.A., Fernández, C.C., Marín, D., Molinillo, J.M. (2009). Root exudates and their relevance to the allelopathic interactions. *Química Nova*. 32: 198-213.
- Paliwal, R.L. (2001). El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción. *FAO: Producción y Protección Vegetal*. 28: 1-3.
- Pandey, G., Jain, R.K. (2002). Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 5789-5795.
- Pereira, R.C., Monterroso, C., Macías, F. (2010). Phytotoxicity of hexachlorocyclohexane: Effect on germination and early growth of different plant species. *Chemosphere*. 79: 326-333.
- Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L., Robaglia, C. (2003). Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell y Environment*. 26: 189-199.
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*. 56: 15-39.
- Podile, A.R., Kishore, G.K. (2007). Plant growth-promoting rhizobacteria. In *Plant-associated bacteria* (pp. 195-230). Springer, Dordrecht.
- Pollard, A.J., Reeves, R.D., Baker, A.J. (2014). Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. *Plant Science*. 217: 8-17.
- Polti, M.A., Amoroso, M.J., Abate, C.M. (2007). Chromium(VI) resistance and removal by actinomycete strains isolated from sediments. *Chemosphere*. 67: 660-667.
- Polti, M.A., Aparicio, J.D., Benimeli, C.S., Amoroso, M.J. (2014). Simultaneous bioremediation of Cr(VI) and lindane in soil by actinobacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 88: 48-55.
- Polti, M.A., Atjián, M.C., Amoroso, M.J., Abate, C.M. (2011). Soil chromium bioremediation: synergic activity of actinobacteria and plants. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65: 1175-1181.
- Pornwongthong, P., Mulchandani, A., Gedalanga, P.B., Mahendra, S. (2014). Transition metals and organic ligands influence biodegradation of 1, 4-dioxane. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 173: 291-306.



- Posada, F.C., Hernández, J.C. (2007). Influencia del aluminio sobre el crecimiento de la raíz en Coliflor (*Brassica oleracea* L., var. Botrytis, Hib. 'Nevada F1'). *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica*. 10: 149-157.
- Prado, C., Pagano, E., Prado, F., Rosa, M. (2012). Detoxification of Cr(VI) in *Salvinia minima* is related to seasonal-induced changes of thiols, phenolics and antioxidative enzymes. *Journal of Hazardous Materials*. 239: 355-361.
- Prado, C., Rodríguez-Montelongo, L., González, J.A., Pagano, E.A., Hilal, M., Prado, F.E. (2010). Uptake of chromium by *Salvinia minima*: effect on plant growth, leaf respiration and carbohydrate metabolism. *Journal of Hazardous Materials*. 177: 546-553.
- Puzon, G.J., Petersen, J.N., Roberts, A.G., Kramer, D.M., Xun, L. (2002). A bacterial flavin reductase system reduces chromate to a soluble chromium(III)-NAD<sup>+</sup> complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 294: 76-81.
- Ramírez, J.A., Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales*. 4: 67-75.
- Ramos, J.L., Marqués, S., van Dillewijn, P., Espinosa-Urgel, M., Segura, A., Duque, E., Solano, J. (2011). Laboratory research aimed at closing the gaps in microbial bioremediation. *Trends in Biotechnology*. 29: 641-647.
- Ravel, J., Amoroso, M.J., Colwell, R.R., Hill, R.T. (1998). Mercury-resistant actinomycetes from the Chesapeake Bay. *FEMS Microbiology Letters*. 162: 177-184.
- Reid, B.J., Jones, K.C., Semple, K. T. (2000). Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments- a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollution*. 108: 103-112.
- Repetto, G., Jos, A., Hazen, M.J., Molero, M.L., Del Peso, A., Salguero, M., Repetto, M. (2001). A test battery for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol. *Toxicology in Vitro*. 154: 503-509.
- Richardson, A.E., Simpson, R.J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiology*. 156: 989-996.
- Roane, T.M., Josephson, K.L., Pepper, I.L. (2001). Dual-bioaugmentation strategy to enhance remediation of cocontaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 3208-3215.

- Rodríguez-Rodríguez, C.E., Castro-Gutiérrez, V., Chin-Pampillo, J. S., Ruiz-Hidalgo, K. (2013). On-farm biopurification systems: role of white rot fungi in deputation of pesticide-containing wastewaters. *FEMS Microbiology Letters*. 345: 1-12.
- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., Bonilla, R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*. 61: 264-272.
- Romero, P.R., Cantú, A.M. (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México. Instituto Nacional de Ecología.
- Saez, J.M., Benimeli, C.S., Amoroso, M.J. (2014). Cell immobilization technique for the enhanced removal of lindane using *Streptomyces* strains isolated from Northwestern Argentina. In *Bioremediation in Latin America* (pp. 289-299). Springer, Cham.
- Salam, J.A., Das, N. (2012). Remediation of lindane from environment-an overview. *International Journal of Biological Research*. 2: 9-15.
- Salinas, R., García, M., Velásquez, A. (2015). Ensayo. Biotecnología y etnomedicina para el desarrollo humano. *Crea Ciencia*. 9: 39-45.
- Sandrin, T.R., Maier, R.M. (2003). Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environmental Health Perspectives*. 111: 1093.
- Saravanan, V.S., Madhaiyan, M., Thangaraju, M. (2007). Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*. 66: 1794-1798.
- Schrijver, A.D., Mot, R.D. (1999). Degradation of pesticides by actinomycetes. *Critical Reviews In Microbiology*. 25: 85-119.
- Schrempf, H. (2006). The family streptomycetaceae, Part II: molecular biology. In *The Prokaryotes* (pp. 605-622). Springer, New York, NY.
- Schwyn, B., Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*. 160: 47-56.

- Semple, K.T., Morriss, A.W.J., Paton, G.I. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science*. 54: 809-818.
- Shahid, M., Shamshad, S., Rafiq, M., Khalid, S., Bibi, I., Niazi, N.K., Rashid, M.I. (2017). Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere*. 178: 513-533.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International*. 31: 739-753.
- Siddiquee, M.A., Chauhan, P.S., Anandham, R., Han, G.H., Sa, T. (2010). Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20: 1577-1584.
- Simón Solá, M.Z., Lovaisa, N., Costa, J.S.D., Benimeli, C.S., Polti, M.A., Alvarez, A. (2019). Multi-resistant plant growth-promoting actinobacteria and plant root exudates influence Cr(VI) and lindane dissipation. *Chemosphere*. 222: 679-687. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.197>.
- Simón Solá, M.Z., Pérez Visñuk, D., Benimeli, C.S., Polti, M.A., Alvarez, A. (2017). Cr(VI) and lindane removal by *Streptomyces* M7 is improved by maize root exudates. *Journal of Basic Microbiology*. 57: 1037-1044.
- Singer, A.C., Crowley, D.E., Thompson, I.P. (2003). Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology*. 21: 123-130.
- Sinha, S., Mukherjee, S.K. (2008). Cadmium-induced siderophore production by a high Cd-resistant bacterial strain relieved Cd toxicity in plants through root colonization. *Current Microbiology*. 56: 55-60.
- Sinha, S., Saxena, R., Singh, S. (2005). Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. *Chemosphere*. 58: 595-604.
- Siñeriz, M.L., Kothe, E., Abate, C.M. (2009). Cadmium biosorption by *Streptomyces* sp. F4 isolated from former uranium mine. *Journal of Basic Microbiology*. 49: S55-S62.

- Sivakumar, S., Subbhuraam, C.V. (2005). Toxicity of chromium(III) and chromium(VI) to the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 62: 93-98.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Berg, G. (2001). Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4742-4751.
- Sobrero, M.C., Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Ensayos toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas*. IDRC/IMTA. 4: 71-79.
- Somasegaran, P., Hoben, H. J. (2012). Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology. Springer Science and Business Media.
- Sumiahadi, A., Acar, R. (2018). A review of phytoremediation technology: heavy metals uptake by plants. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 142
- Sziderics, A.H., Rasche, F., Trognitz, F., Sessitsch, A., Wilhelm, E. (2007). Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*. 53: 1195-1202.
- Taechowisan, T., Peberdy, J.F., Lumyong, S. (2003). Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19: 381-385.
- Taj, Z.Z., Rajkumar, M. (2016). Perspectives of plant growth-promoting actinomycetes in heavy metal phytoremediation. In *Plant Growth Promoting Actinobacteria*. (pp. 213-231). Springer, Singapore.
- Tang, X., Shen, C., Shi, D., Cheema, S.A., Khan, M.I., Zhang, C., Chen, Y. (2010). Heavy metal and persistent organic compound contamination in soil from Wenling: an emerging e-waste recycling city in Taizhou area, China. *Journal of Hazardous Materials*. 173: 653-660.
- Tripathi, M., Munot, H.P., Shouche, Y., Meyer, J.M., Goel, R. (2005). Isolation and functional characterization of siderophore-producing lead-and cadmium-resistant *Pseudomonas putida* KNP9. *Current Microbiology*. 50: 233-237.

- Uren, N.C. (2000). Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In *The Rhizosphere* (pp. 35-56). CRC Press.
- US EPA (1994). United States Environmental Protection Agency. Method 218.6: Determination of dissolved.
- US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency. Toxicological Review for Hexavalent Chromium. CASNR. 18540-29-9. Washington.
- US EPA (2000). United States Environment Protection Agency. In situ treatment of soil and groundwater.
- Vamerali, T., Bandiera, M., Mosca, G. (2010). Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters*. 8: 1-17.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 36: 453-483.
- Van Zwieten, L., Ayres, M.R., Morris, S.G. (2003). Influence of arsenic co-contamination on DDT breakdown and microbial activity. *Environmental Pollution*. 124: 331-339.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., van der Lelie, D. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research*. 16: 765-794.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F. y van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71: 495-548.
- Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586.
- Vigjen, J. (2006). The legacy of lindane HCH isomer production. A global overview of residue management, formulation and disposal. *International HCH pesticides Asssociation*. 383:384

- Walkley, A., Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil science*. 37: 29-38.
- Wang, H., Xu, R., You, L., Zhong, G. (2013). Characterization of Cu-tolerant bacteria and definition of their role in promotion of growth, Cu accumulation and reduction of Cu toxicity in *Triticum aestivum* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 94: 1-7.
- Wang, W.C., Freemark, K. (1995). The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 30: 289-301.
- Wang, X., Chen, X., Liu, S., Ge, X. (2010). Effect of molecular weight of dissolved organic matter on toxicity and bioavailability of copper to lettuce. *Journal of Environmental Sciences*. 22: 1960-1965.
- Wenzel, W.W. (2009). Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant and Soil*. 321: 385-408.
- Wood, T.K. (2008). Molecular approaches in bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 19: 572-578.
- Zayed, A.M., Terry, N. (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant and Soil*. 249: 139-156.
- Zazo, J.A., Paull, J.S., Jaffe, P.R. (2008). Influence of plants on the reduction of hexavalent chromium in wetland sediments. *Environmental Pollution*. 156: 29-35.
- Zhang, H., Dang, Z., Zheng, L.C., Yi, X.Y. (2009). Remediation of soil co-contaminated with pyrene and cadmium by growing maize (*Zea mays* L.). *International Journal of Environmental Science and Technology*. 6: 249-258.
- Zhang, X., Wang, H., He, L., Lu, K., Sarmah, A., Li, J., Huang, H. (2013). Using biochar for remediation of soils contaminated with heavy metals and organic pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*. 20: 8472-8483.
- Zou, J., Yu, K., Zhang, Z., Jiang, W., Liu, D. (2009). Antioxidant response system and chlorophyll fluorescence in chromium(VI)-treated *Zea mays* L. seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 51: 23-33.







