



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS y NATURALES**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

**TESINA PRESENTADA PARA OBTENER  
EL GRADO ACADÉMICO DE  
LICENCIADO EN QUIMICA**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS  
BIODEGRADORAS DEL HERBICIDA IMAZAPIR**

**AUTOR: Katia Duran  
Director: Carlos Moldes**

SANTA ROSA (LA PAMPA)

ARGENTINA

2011

## **PREFACIO**

Esta tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevo a cabo en Laboratorio del departamento de Química, dependiendo del Departamento de Química, durante el periodo comprendido entre el 3 de Noviembre del 2010 y el 29 de Abril del 2011 , bajo la dirección de Dr. Moldes, Carlos; y bajo la codirección de Dra. Bellozas, Monica.

29/04/2011

Duran, Katia

Departamento de Química

FACULTAD DE CIENCIAS

EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE

LA PAMPA

# Índice

## Resumen

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Problemática.....	1
1.2 El herbicida Imazapir.....	2
1.2.1 Persistencia en suelos.....	4
1.2.2 Comportamiento en el medio ambiente.....	5
1.3 Biodegradación y biorremediación microbiana.....	6
<b>2. Hipótesis.....</b>	<b>9</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>9</b>
<b>4. Materiales y Métodos.....</b>	<b>10</b>
4.1. Metodología de aislamiento de microorganismos biodegradadores de Imazapir.....	10
4.1.1. Acondicionamiento de microcosmos.....	10
4.1.2 Medio de enriquecimiento de bacterias biodegradadoras de Imazapir.....	10
4.2 Caracterización de aislamientos biodegradadores de Imazapir.....	10
4.2.1 Tinción Gram.....	10
4.2.2. Electroforesis de isoenzimas (M.L.E.E).....	11
4.2.2.1 Tratamiento de muestras.....	11
4.2.2.2 Determinación de la concentración de proteínas.....	11
4.2.2.3 Corrida electroforética.....	12
4.2.3 Desarrollo en medio líquido de aislamientos biodegradadoras de Imazapir.....	12
4.2.3.1 Curvas de crecimiento en medio LB.....	12
4.2.3.2 Curvas de crecimiento en medio IMACN e IMAN.....	13

4.3 Ensayo en cámara.....	13
4.3.1 Material vegetal y acondicionamiento de plántulas.....	13
4.3.2 Inoculación de plántulas con bacterias biodegradadoras de Imazapir.....	14
4.4 Medios de cultivo utilizados.....	14
4.5 Métodos de conservación.....	17
<b>5. Resultados y discusión.....</b>	<b>18</b>
5.1 Aislamiento de bacterias biodegradadoras de Imazapir.....	18
5.2 Tinción gram.....	19
5.3 Diferenciación de los aislamientos de bacterias biodegradadoras de Imazapir.....	20
por medio de la técnica electroforesis de isoenzimas (M.L.E.E.)	
5.4 Curvas de crecimiento de aislamientos biodegradadores de Imazapir.....	22
5.4.1 Curvas de crecimiento en medio LB.....	22
5.4.2 Curvas de crecimiento en medio IMACN e IMAN.....	24
5.5 Ensayo en cámara climatizada con plantas de Alfalfa (Medicago Sativa).....	28
5.5.1 Primer ensayo: inoculación de plantas de alfalfa con alta concentración de inóculo	29
5.5.2 Segundo ensayo: inoculación de plantas de alfalfa con baja.....	30
concentración de inóculo	
5.5.3 Tercer ensayo: inoculación de plantas de alfalfa con distintas diluciones de inóculo	31
<b>6. Conclusión.....</b>	<b>34</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>36</b>

## **RESUMEN**

Los agroquímicos que son utilizados en exceso en las producciones agrícolas son potenciales causantes de contaminación de aguas subterráneas, alimentos y pérdida de microorganismos benéficos necesarios para mantener la estructura y la diversidad de los suelos.

El amplio daño a la biodiversidad, a la salud pública y a los ecosistemas causado por contaminantes químicos ha motivado a los científicos a buscar estrategias para el secuestro y remoción de tales sustancias. El aislamiento, caracterización e identificación de microorganismos degradadores de plaguicidas junto con el conocimiento de las correspondientes vías catabólicas tienen el potencial para resolver problemas de contaminación de suelos por plaguicidas persistentes. Por esta razón, ha empezado a recibir atención la aplicación de tecnologías microbiológicas para la remoción de xenobióticos en ambientes contaminados. El reto es identificar métodos biológicos de degradación microbiana de diferentes herbicidas.

Mediante la utilización de microcosmos fueron obtenidos aislamientos de bacterias biodegradadoras de Imazapir a través de cultivo en medio de enriquecimiento las cuales se caracterizaron mediante electroforesis, tinción gram y curvas de crecimiento. Se evaluó en cámara la capacidad de inducir o inhibir el crecimiento de plantas de alfalfa. Se obtuvieron 9 aislamientos diferentes de los cuales 2 generan inhibición del crecimiento de raíz.

Los aislamientos obtenidos son potencialmente útiles para la incorporación en inoculantes con destino de biorremediación y fitorremediación.

## **ABSTRACT**

The chemicals that are used in excess in agricultural production are potential pollutants of groundwater, food and loss of beneficial microorganisms needed to maintain the structure and diversity of soils.

The extensive damage to biodiversity, public health and ecosystems caused by chemical pollutants has led scientists to seek strategies for sequestering and removal of such substances. The isolation, characterization and identification of pesticide degraders with knowledge of the corresponding catabolic pathways have the potential to solve soil contamination caused by persistent pesticides. For this reason, attention has begun to receive the application of microbial technologies for the removal of xenobiotics in contaminated environments. The challenge is to identify biological methods of microbial degradation of various herbicides.

Microcosms using bacterial isolates were obtained Imazapyr biodegrader through enrichment culture medium which were characterized by electrophoresis, Gram staining and growth curves. Was evaluated in a camera's ability to induce or inhibit the growth of alfalfa plants. 9 different isolates were obtained including 2 generate root growth inhibition.

Isolates obtained are potentially useful for incorporation into target inoculants for bioremediation and phytoremediation.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Problemática

La agricultura ha experimentado en los últimos años profundos cambios en distintos aspectos (labores culturales, semillas, fertilización, protección vegetal, biotecnología, maquinarias, irrigación) haciendo posible que los rendimientos aumenten en la misma proporción que la población. La modernización de la agricultura y el incremento de las producciones han sido acompañados de un aumento de insumos y actividades agrícolas limitando la práctica de lo que se llama agricultura sustentable (Bailey, 1997). Entre ellos se puede mencionar el uso de plaguicidas que ha aumentado muy rápidamente desde la primera introducción de químicos sintéticos para su uso en protección de cultivos (Sreenivasulu et al. 2001). Los plaguicidas llegan al suelo y pueden persistir por largos períodos causando daño a los microorganismos del suelo y al crecimiento de las plantas (Cook et al., 1995).

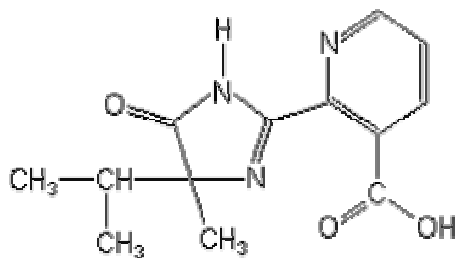
Los residuos peligrosos se generan en la industria de plaguicidas tanto a nivel de consumidores como de productores. Con el fin de garantizar la producción, manipulación y utilización de estos productos químicos agrícolas, las directrices ambientales han establecido reglamentos que rigen estos procedimientos. Sin embargo, una vez que el plaguicida se ha distribuido a los consumidores individuales no existe ninguna tecnología de desintoxicación disponible para la eliminación de los envases de plaguicidas, tanques de pulverización y las soluciones de rociado (Sreenivasulu et al., 2001).

En presencia de agroquímicos, algunos microorganismos pueden ser eliminados y otros pueden proliferar en los nichos ecológicos vacantes. La disminución en la diversidad microbiana tanto bacteriana como fúngica, en general resulta en la disminución de la capacidad de responder a las perturbaciones en un determinado ecosistema. También, la diversidad microbiana refleja el estado y la historia de un determinado microambiente con manejo agrícola y además la diversidad por sí misma es un indicador de cuanto ha sido deteriorado un ecosistema (Johnsen et al., 2001), dado que algunos grupos microbianos son capaces de utilizar los plaguicidas como fuente de energía y nutrientes mientras que, para otros microorganismos, les puede ser tóxico. El estudio de la biodegradación de compuestos organoclorados se ha desarrollado durante casi 100 años desde los primeros reportes realizados por Penfold (1913). La enzima responsable de la degradación de

compuestos organoclorados, la dehalogenasa, fue descubierta por Jensen (1952). El interés por estas dehalogenasas creció después de ser observado que bacterias podían crecer y desarrollarse en medios con Dalapon (Magee & Colmer, 1959) como única fuente de carbono. A partir de allí se han realizado una vasta cantidad de estudios de aislamiento y la caracterización de microorganismos con potencial para degradar sustancias químicas así como estudios para descubrir los caminos metabólicos para la biodegradación de plaguicidas (Kerr y Marchesi, 2006, Johnsen et al., 2001).

## 1.2. El herbicida Imazapir

El Imazapir (2-[4,5-dihidro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il]-3-piridin carboxílico) (figura 1) es un herbicida perteneciente a la familia de las imidazolinonas (Ware et al., 2004), las cuales son inhibidores de aminoácidos de cadena ramificada. En este grupo se incluyen: Imazapir, Imazaquin, Imazethapir, Imazamethabenz (Caseley, 1996).



**Fig. 1:** Estructura química de la molécula Imazapir

Es un herbicida sistémico, no selectivo y de amplio espectro con actividad residual en áreas sin cultivos y en áreas forestales (Ware et al., 2004); es utilizado principalmente en el control de un gran número de malezas de hoja ancha y gramíneas (Rubin, 1999) La reducción de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina es consecuencia de la inhibición de la acetolactato sintasa (ALS), una enzima común en los procesos biosintéticos de estos aminoácidos de cadena ramificada, necesarios para la síntesis de proteínas y el crecimiento



celular (Shaner y Singh, 1992). Imazapir es un inhibidor no competitivo de la acetolactato sintasa (Shaner et al. 1984, Anderson and Hibberd 1985). Esta inhibición de la enzima se produce como consecuencia de la unión entre la molécula del herbicida y la de la enzima. (Terralia, 2010). Se absorbe rápidamente a través de la parte aérea y de las raíces de las hierbas y es translocado vía xilema y floema acumulándose en las regiones meristémicas (Trejos, 2005); poco tiempo después de la aplicación la planta sufre detención del crecimiento, apareciendo los síntomas primero en las hojas y después en el resto de los órganos. Esta acción desencadena una alteración total del metabolismo al interrumpir la síntesis proteica y en consecuencia, el crecimiento celular. Las especies sensibles rápidamente detienen el crecimiento, dado que afectan principalmente los tejidos de las zonas meristemáticas (Espinoza et al., 2009). La tasa de muerte de la planta por lo general es lenta (varias semanas) y probablemente se relaciona con la cantidad almacenada de aminoácidos disponibles para la planta. La biosíntesis de las cadenas de aminoácidos y, por consiguiente, el crecimiento de la planta se inhibe unas 8 horas después de la aplicación. La muerte de los meristemas ocurre unos 4 días después de la aplicación, y los signos de clorosis en las hojas más jóvenes o necrosis de los tejidos aparecen posteriormente, dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales, el proceso total de muerte puede ser más o menos rápido (Tu, 2004). Los posibles síntomas de toxicidad que presentan las plantas son clorosis marginal, hojas verde oscuro, hojas moradas, lesiones foliares, distorsión foliar (Arauz ,1998). En las especies perennes se transloca a los órganos subterráneos de reserva, los cuales destruye evitando rebrotes.

El herbicida Imazapir tiene buena actividad residual, lo que se traduce en el control en pre-emergencia de nuevas germinaciones de semillas durante varios meses después de la aplicación. Es un herbicida no selectivo que puede ser aplicado tanto en pre-emergencia como en post-emergencia de las hierbas, pero es más eficaz cuando se aplica como un herbicida post-emergente (Hart et al., 1991). Se debe tener cuidado en su aplicación en torno a las especies no-objetivo, ya que es fácilmente absorbido a través de follaje y raíces, y por lo tanto, podría ser perjudicial por la deriva, la escorrentía o lixiviación de las raíces de las plantas tratadas (Tu, 2004).

### **1.2.1. Persistencia en suelos**

La persistencia de un herbicida en el suelo puede definirse como el período de tiempo durante el cual permanece en forma activa en el mismo (Comfort et al., 1994). Este proceso es extremadamente importante debido a que determina el tiempo que permanece en el ambiente y el período en que pueden esperarse efectos fitotóxicos sobre las malezas (Ashton y Mónaco, 1991). El conocimiento de este parámetro es importante para su correcta utilización. Desde un punto de vista agronómico es conveniente que sea suficiente para controlar las malezas en todo el ciclo del cultivo, pero los herbicidas no deben persistir como para afectar al cultivo que sigue en la rotación (Istilar, 2002).

Una serie de complejos procesos entre los que se cuentan la degradación (descomposición química, microbiana y fotodescomposición), la retención (adsorción por los coloides del suelo) y el transporte (lixiviación, volatilización, escurrimiento superficial y absorción por las plantas) regulan la persistencia de un herbicida en el suelo (Hance and Holly, 1990).

La adsorción de Imazapir a las partículas del suelo es generalmente débil, pero puede variar dependiendo de las propiedades del suelo (Mangels, 1991), incrementándose cuando el contenido de arcilla y materia orgánica aumentan, con condiciones de baja humedad en el suelo y con valores de pH menores a 5, siendo este un proceso reversible (Wehtje et al., 1987). Debido a que el Imazapir es un herbicida ácido débil, el pH del medio ambiente va a determinar su estructura química, que a su vez determina su persistencia y movilidad en el medio ambiente (Stougaard et al. 1990). Puede existir en forma catiónica, neutra y aniónica. La repulsión de las moléculas aniónicas explica por qué la materia orgánica refuerza la adsorción de Imazapir sólo en suelos con bajo pH (Pusino et al., 1997). A valores de pH inferiores a 5 la capacidad de adsorción de Imazapir y los límites de su movimiento en el suelo aumentan (Loux et al., 1989). Por encima de pH 5, Imazapir se ioniza, aumentando su carga negativa, y la limitación de su capacidad para unirse con los suelos (Mangels, 1991). También los óxidos de hierro amorfos refuerzan la adsorción (Pusino et al., 1997).

Imazapir no se volatiliza fácilmente cuando se aplica en el campo. El potencial con que se volatiliza aumenta con la temperatura, la humedad del suelo, y disminución de arcilla y materia orgánica (Helling et al. 1971).

Es rápidamente degradado por la luz solar en soluciones acuosas. En los suelos, sin embargo, hay poca fotodegradación de Imazapir (WSSA, 1994). Su vida media en solución

acuosa es de aproximadamente dos días, y disminuye con el aumento de pH (Mallipudi et al. 1991, Mangels 1991).

La persistencia es influenciada por las condiciones del suelo (textura, contenido de materia orgánica, nutrientes, cationes y pH), del ambiente (temperatura, humedad y luz solar) y del plaguicida (solubilidad en agua, coeficiente de partición en adsorción, presión de vapor y naturaleza química) (Ashton y Mónaco, 1991; Hager et al., 2000).

La degradación microbiana es el principal mecanismo que actúa sobre Imazapir en el suelo (WSSA, 1994; Minogue et al., 2000). American Cyanamid (1986) informó que la vida media de Imazapir en los suelos típicamente va desde uno a siete meses, dependiendo del tipo de suelo, la temperatura y la humedad del suelo (Mangels, 1991). La vida media de Imazapir es más corta en las temperaturas del suelo más fresco (25 ° C versus 35 ° C) y en suelos arenosos (franco arenoso frente a franco arcilloso) (American Cyanamid, 1986). Las tasas de degradación disminuyen en condiciones de suelo anaeróbico. Imazapir que se enlaza fuertemente a las partículas del suelo puede no estar disponible para la degradación microbiana (WSSA, 1994).

### **1.2.2. Comportamiento en el medio ambiente**

Los rangos de vida media de Imazapir en el suelo oscilan entre 25 y 142 días, siendo más corta en suelos arenosos y con temperaturas elevadas (Vencill, 2002). A las dosis usadas en áreas no cultivadas, puede persistir en el suelo durante más de un año (Caseley et al., 1996). Su actividad en el suelo se mantiene, en condiciones de campo, entre 3 meses y 2 años (Mallipudi et al., 1991).

Los factores que afectan las tasas de degradación son difíciles de identificar debido a que dependen del pH y éste varía con la temperatura y contenido de materia orgánica (Dowell et al., 1997). En un ejemplo más extremo, Vizantinopoulos y Lolos (1994) encontraron que, en suelos franco y franco arcillosos, con pH 8.7, la vida media es de hasta 50 meses. Además la persistencia en el suelo se ve influenciada por la humedad del suelo; en condiciones de sequía, Imazapir persiste durante más de un año (People, 1984). En la

mayoría de las condiciones de campo Imazapir no se une fuertemente a los suelos y puede ser altamente disponible en el medio ambiente. Por encima de pH 5, el herbicida se encuentra en forma ionizada, aumentando el riesgo de escorrentía.

Una vez adsorbido en el suelo, el movimiento lateral prácticamente no existe y el vertical es limitado por lo que la lixiviación es baja. Su potencial de acumulación en el medio ambiente es muy bajo. En las plantas, después de una aplicación foliar, los residuos decaen rápidamente en las primeras 24 horas y se exudan desde las raíces al suelo (Terralia, 2010).

Imazapir es un herbicida de acción lenta que no se metaboliza fácilmente en las plantas. Puede ser muy eficaz contra las especies leñosas. La forma de aplicación es sumamente importante dado que de ello depende su eficiencia y persistencia en el medio ambiente, por lo cual puede ser preferible aplicar Imazapir directamente a la vegetación (con una mochila de bajo volumen, tocón o la aplicación de la corteza basal) en lugar de utilizar un método de pulverización por difusión (Vollmer, 2003).

Debido a que Imazapir mata a una gran variedad de plantas y puede ser relativamente persistente en los suelos, es posible que se generen daños indeseables en las plantas no objetivo. Cuando Imazapir se aplica en altas tasas, directamente al suelo, puede dar lugar a la actividad en el suelo a lo largo de toda la temporada. Especies de plantas que son resistentes a Imazapir aparentemente lo metabolizan a una forma inmóvil que no puede ser trasladado a los tejidos meristemáticos (Shaner and Mallipudi, 1991).

### **1.3. Biorremediación y biodegradación microbiana**

Biorremediación es la eliminación de xenobióticos contaminantes del medio ambiente mediante el uso de microorganismos y es un reto científico cada vez más importante y en rápida expansión (Ilyina et al., 2003). Es un método rentable para degradar compuestos tóxicos y convertirlos en productos inocuos. Se ha reportado para muchos compuestos una exitosa eliminación de plaguicidas del suelo por bacterias agregadas (Karpouzas et al., 2000; Struthers et al., 1998). Diversas bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*,

poseen la capacidad de catabolizar diversos herbicidas (Zanardini et al., 2002; Ellis et al., 2006; Gu et al., 2007), que los hacen candidatos ideales para la biorremediación de medio ambiente contaminado con herbicida. La biodegradación es frecuentemente propuesta como un método efectivo para la remediación de sitios contaminados químicamente (Balba et al. 1998). Los procesos de biodegradación se deben fundamentalmente a la microflora del suelo (bacterias y hongos). Los microorganismos degradadores de plaguicidas se encuentran tanto en suelos y medios acuáticos como en aguas residuales de tratamiento de plantas, además de que un gran número y diversidad de microorganismos pueden ser encontrados en suelos de cultivo. (Cruz, 2007)

La biorremediación consiste en la inoculación con cepas de microorganismos que son capaces de degradar las moléculas de contaminante. Idealmente, la degradación completa (mineralización) de los contaminantes es deseable, pero, como mínimo, debe ser alcanzada su transformación en productos no tóxicos. Son relativamente pocos los herbicidas aplicados al suelo que han demostrado ser susceptibles a la mineralización de cultivos puros de microorganismos (Shelton et al. 1996).

Dos cepas degradadoras del herbicida Imazapir identificadas como *Pseudomonas fluorescens biotype II* (ZJX-5) y *Bacillus cereus* (ZJX-9) (Xuedong et al 2005) fueron aisladas por los métodos de diluciones seriadas y siembra en suelo enriquecido con Imazapir.

La cepa IM-4 (Xing et al. 2009) identificada como *Pseudomona sp.* fue aislada de suelos contaminados y utilizada para degradar el herbicida Imazetapir. IM-4 tiene la capacidad de degradar otros herbicidas de la familia de las Imidazolinonas como Imazapir, Imazapic e Imazamox. (Xing et al. 2009).

La especie bacteriana *Crystallopoietes arthrobacter* (designada como cepa WWX-1) (Xuedong et al., 2007) es capaz de utilizar Imazaquin como única fuente de carbono. Fue aislada de suelos con aplicaciones repetidas del mismo. El crecimiento de WWX-1 también se observó en presencia de otros herbicidas Imidazolinona como Imazetapir e Imazapir, sin embargo fue menor que con Imazaquin (Xuedong et al., 2007).

*Streptomyces* (cepa PSI/ 5) (Shelton et al., 1996) fue utilizada para metabolizar doce herbicidas: Alaclor, Metolaclor, Atrazina, Prometrina, Ametrina, Linuron, Tebutiuron y Bromacil sufrieron transformaciones mayores al cincuenta por ciento; Imazapir, Cianazina, Diuron y Metribuzin se transformaron en menor medida (Shelton et al. 1996).

Una cepa degradadora de Imazetapir perteneciente al género *Alcaligenes sp.* designada como cepa *BH-1* (Ding et al.2008) se aisló de la mezcla de lodos de fabricas de producción de Imazetapir. A pH 5 la bacteria puede degradar todo el Imazetapir, pero a pH 8-9 fue degradado solo el 50% (Ding et al.2008).

Una cepa de microorganismos capaces de degradar Acetoclor, designado como *ACL2* (Xu et al. 2006), fue aislado de suelo contaminado con dicho herbicida. La cepa fue identificada como *Pseudomonas oleovorans* (Xu et al. 2006).

Una bacteria degradadora de Diclorvos (cepa *DDV-1*) (Zhang, et al. 2006) fue aislada e identificada como *Ochrobactrum sp.* Utilizó Diclorvos como única fuente de carbono (Zhang, et al. 2006).

Seis microorganismos capaces de degradar Atrazina se aislaron de un suelo agrícola que recibió la exposición repetida de Atrazina y herbicidas de uso común como Acetoclor. Estas cepas fueron identificadas como Gram positivas y pertenecen a los géneros *Nocardioides* y *Arthrobacter* (Vibber et al., 2007). Los seis aislamientos fueron capaces de utilizar atrazina como única fuente de nitrógeno cuando se les proporcionó glucosa como fuente de carbono. Ninguno de los aislamientos utilizó atrazina como única fuente de carbono y nitrógeno (Vibber et al., 2007).

La cepa *S113* (Huang et al. 2007) capaz de degradar Metsulfurón-metil, se aisló de suelos tratados con metsulfurón-metil. Fue identificada como *Methylopila sp.* de acuerdo a sus características fenotípicas y análisis filogenético del ADNr 16S. Es gram negativa. Esta cepa podría utilizar metsulfurón metilo como la única fuente de carbono y nitrógeno. Esta cepa también podría degradar Bensulfuron-metil, Metil-tifensulfurón y Metil ethametsulfuron (Huang et al. 2007).

## **2. HIPOTESIS**

Se plantea como hipótesis de este trabajo que suelos con limitaciones de producción agrícola albergan microorganismos biodegradadores de sustancias orgánicas que podrían ser utilizados para la solución de problemas de contaminación de suelos con el herbicida Imazapir.

## **3. OBJETIVOS**

- ✓ El presente proyecto tiene como objetivo aislar, caracterizar, seleccionar y mantener microorganismos con capacidad degradadora del herbicida Imazapir a partir de suelos de la provincia de La Pampa que sean potencialmente útiles para la incorporación en inoculantes con destino de biorremediación y fitorremediación.
- ✓ Identificar aislamientos que puedan ejercer efectos positivos o negativos en el crecimiento de cultivos de plantas de alfalfa.

## **4. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1. Metodología de aislamiento de microorganismos biodegradadores de Imazapir**

#### **4.1.1. Acondicionamiento de microcosmos**

El aislamiento de bacterias degradadoras de Imazapir se realizó a partir de muestras de suelos de la Provincia de La Pampa en condiciones limitantes de productividad. (Metileo, Uriburu, Embajador Martini, Doblas)

Los suelos fueron acondicionados en microcosmos y adicionados de Imazapir en una cantidad de 100 mg de herbicida Kg<sup>-1</sup> de suelo para que bacterias nativas sean expuestas al herbicida durante dos semanas.

#### **4.1.2. Medio de enriquecimiento de bacterias biodegradadoras de Imazapir**

Bacterias biodegradadoras de Imazapir se obtuvieron a partir de 1 gr de suelo el cual fue colocado en medios mínimos líquidos (Smith, 2005) enriquecidos con Imazapir como fuente de carbono y nitrógeno (Tabla 1), y como fuente de nitrógeno (Tabla 2) suplementado con 1 g L<sup>-1</sup> de glucosa. El desarrollo de este cultivo se efectuó en cámara a 28 °C durante 3 días hasta obtención de opalescencia en el cultivo.

Una alícuota de cultivos IMACN (tabla 1) e IMAN (tabla 2) desarrollados en cámara fue trasvasando a medio sólido (IMACN) con posteriores estriados hasta lograr la purificación de bacterias con capacidad biodegradadora de Imazapir.

### **4.2. Caracterización de aislamientos biodegradadores de Imazapir**

#### **4.2.1 Tinción Gram**

Se realizó tinción de gram para elucidar el carácter gram positivo o negativo de las bacterias biodegradadoras de Imazapir. Se utilizó el kit para tinción gram BRITANIA.



## **4.2.2. Electroforesis de isoenzimas (M.L.E.E)**

### **4.2.2.1 Tratamiento de muestras**

Las bacterias se hicieron crecer en medio TY (tabla 3) en erlrmeyer de 250 ml con 50 ml de medio durante 48 hs a 28 °C con agitación.

Luego se realizó el tratamiento de la muestra, para ello, se centrifugo a 10.000 rpm (centrifuga Rolco CR5150) durante 30 minutos a 4°C. Se volcó el sobrenadante y el precipitado se lavó y resuspendió con 1 ml de solución de NaCl (0.85%). Se recogió en tubos eppendorff y se centrifugó durante 10 minutos a 15.000rpm en centrifuga Eppendorf 5414. Se volcó nuevamente el sobrenadante y se recogió en 0.5 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 0.1 M y p H 7.2; MgCl<sub>2</sub>, glicerol 15% y mercaptoetanol 0.1%), se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 minutos y se resuspendió con el mismo tampón con lizosima en concentración 1 mg/ml, después de incubar 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 10 minutos a 1.500 rpm y se resuspendio con tampón de sonicación (Tris-HCl 0.1 M, pH8.8, y glicerol 15 %). Se sonico (Sonicador KONTES microultrasonic cell disrupter) durante seis ciclos de 30 segundos. Por último, se centrifugó durante 10 minutos y el sobrenadante se reservó para posterior análisis.

### **4.2.2.2. Determinación de la concentración de proteínas**

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Bradford (1976). Se utilizo como patrón una curva de calibración realizada con BSA (Bovine Serum Albumine-sigma) en un rango que va desde 10 a 100 µg de proteínas. Luego se leyó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595 nm utilizando un blanco con agua miliQ.

Los µg de proteína medidos están contenidos en un volumen de 25 µl de muestra. Esto se tuvo en cuenta para el cálculo de la cantidad de volumen necesario para que cada calle del gel contenga una concentración de proteínas de 60 µg.

Preparación del reactivo de Bradford: Se disolvió 200 mg de Azul de Coomassie brillante G-250 en 50 ml de etanol al 95%, se mezcló cuidadosamente por 2 horas y se adicionó lentamente 100 ml de ácido fosfórico (85% p/v). Se mezcló nuevamente 2 hs y se dejó en reposo por 24 hs. Se completó el volumen con agua destilada mili Q hasta 1 litro. Se dejó en reposo 24 hs y la solución se filtró a través de un papel de filtro.

#### **4.2.2.3. Corrida electroforética**

La corrida electroforética se realizó usando gel de poliacrilamida al 5% para el gel concentrador y 10% para el separador. La electroforesis se desarrolló en una cuba electroforética, a voltaje constante (200 V) y utilizando buffer de corrida de la siguiente composición: 15 g/l de Tris; 71 g/l de glicina pH 8,3. Fueron sembrados en cada calle 60 µg de proteínas.

Se coloreó para  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas, con Fast Blue RR y  $\alpha$  y  $\beta$  naftil acetato como sustrato (Grassano A., et al; 1996).

#### **4.2.3. Desarrollo en medio liquido de aislamientos biodegradadoras de Imazapir**

##### **4.2.3.1. Curvas de crecimiento en medio LB**

Se inició el cultivo a partir de una anizada obtenida de tubos de conservación de agar inclinado y se colocaron en erlrmeyer de 250 ml de capacidad con 50 ml de medio LB (tabla 4). Se utilizó una relación 1/5 volumen medio/ volumen recipiente, para conseguir una correcta aeración de los cultivos. Una vez sembrados los erlrmeyer se colocaron en agitador rotatorio en cuarto estufa a 28°C a 250 rpm y 2.5 cm de excentricidad durante 24 hs. Luego, se trasvasó a erlrmeyer de 500 ml con 100 ml de medio desarrollo (tabla1) la cantidad de inculo necesaria de manera de obtener inicialmente una concentración de aproximadamente  $10^8$  células viables/ml.

Se midió la concentración celular cada 2hs durante un periodo de 32 hs, por el método turbidimétrico utilizando un espectrofotómetro UV-visible Metrolab VD-40 a 600nm. Las muestras fueron diluidas apropiadamente a fin de que los valores de absorbancia leídos estuvieran comprendidos entre 0.2 y 0.8. Estos valores corregidos por dilución se expresaron como unidades de densidad óptica (U.D.O.). Junto con la medición de la UDO, se determinó el pH del medio.

#### **4.2.3.2. Curvas de crecimiento en medio IMACN e IMAN**

Se procedió a desarrollar un cultivo bacteriano en erlermeyer de 250 ml con 50 ml de medio LB diluido 1:2 a partir de una anzada de bacteria obtenida del medio de conservación, durante 24 hs en cuarto estufa a 28°C y con agitación. Luego, se trasvasó a erlermeyer de 500 ml con 100 ml de medio de desarrollo IMACN (Tabla 1) e IMAN (Tabla 2) respectivamente 1ml de inóculo.

Se midió la concentración celular y el pH cada 2 hs durante un periodo de 54 hs utilizando un espectrofotómetro UV-visible Metrolab VD-40 a 600 nm.

### **4.3. Ensayo en cámara**

#### **4.3.1. Material vegetal y acondicionamiento de plántulas**

Fueron utilizadas semillas de Alfalfa Palaversich (grupo 7). Estas fueron esterilizadas con etanol 95% durante 30 segundos, 3 minutos con hipoclorito de sodio al 2% y sucesivos lavados con agua estéril (5 veces). Luego se colocaron para germinar durante 24 h. en cajas de Petri con discos con papel de filtro humedecidos (previamente esterilizadas).

Semillas con aproximadamente 5 mm de radícula (desarrolladas en cámara durante 48 hs), fueron sembradas en tubos conteniendo medio Jensen (Tabla 5) de modo que el extremo de la radícula quedara debajo de la superficie del agar. Se sembraron tres semillas por tubo manteniendo condiciones de esterilidad durante todo el proceso.

Los tubos se colocaron en soportes de madera de modo que la superficie del agar coincidiera con el borde del soporte, para proteger a las raíces de la luz. La disposición de los mismos fue al azar. Se usó iluminación lateral empleando doble hilera de tubos Grolux por sus emisiones de  $\lambda$  entre 400-500 nm (favorecen síntesis de clorofila). El fotoperiodo se controló con reloj automático de modo de tener 16 h diarias de luz. La temperatura se mantuvo controlada en el rango de 22-25°C.

Con el objetivo de homogeneizar el ensayo luego de cuatro días se procedió a la extracción de una de las plántulas de modo que quedaran dos por tubo.

### 4.3.2. Inoculación de plántulas con bacterias biodegradadoras de Imazapir

En los ensayos en cámara se inocularon plántulas de 2 semanas con 1 ml de inóculo de bacterias degradadoras de Imazapir; obtenidas a partir del desarrollo de cada aislamiento en medio líquido LB durante 24 h lo cual se aproxima a la fase exponencial de la curva de crecimiento. Se realizaron tres ensayos consecutivos, en el primer ensayo las plántulas se inocularon con cultivo de bacterias sin diluir; en el segundo con cultivo de bacterias diluido y en el tercer ensayo se inocularon con cultivo de bacterias sin diluir y diluciones de  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  del mismo.

A las cuatro semanas de implantado el ensayo, se cosecharon las plantas y se determinó peso seco de parte aérea y raíz en estufa a  $65^{\circ}\text{C}$  con circulación de aire hasta lograr peso constante.

### 4.4. Medios de cultivo utilizados

**Tabla 1:** Medio IMACN utilizado para el aislamiento de bacterias biodegradadoras de Imazapir. (Modificación de Smith 2005)

Componentes	Concentración (g/l)
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	50
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	20
$\text{MgSO}_4$	20
Imazapir	20
Agar*	15

pH =7

\* Para preparar medio sólido

**Tabla 2:** Medio IMAN utilizado para el aislamiento de bacterias biodegradadoras de Imazapir.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración (g/l)</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20
MgSO <sub>4</sub>	20
Glucosa	1
Imazapir	15,21
Agar*	15

pH =7

\*Para preparar medio solido

**Tabla 3:** Medio TY, para caracterización por el método M.L.E.E (electroforesis de multilocus enzimática). Beringer, J.E.R. (1974).

<b>Componentes</b>	<b>Concentración (g/l)</b>
Extracto de levadura	3
Triptona	5
CaCl <sub>2</sub>	0.87

p H = 7.0

**Tabla 4:** Medio LB (Luria Bertani), utilizado para mantenimiento de bacterias biodegradadoras de Imazapir.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración (g/l)</b>
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Agar	18

p H = 7.0

**Tabla 5:** Medio Jensen, utilizado para el desarrollo de cultivos de plántulas en cámara climatizada. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (1998)

<b>Componentes</b>	<b>Concentración (g/l)</b>
CaHPO <sub>4</sub>	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.2
FeCl <sub>3</sub>	0.1
Agar	12

p H = 7.0

#### **4.5. Métodos de conservación**

El método que se utilizó para la conservación de los microorganismos fue en tubos con agar inclinado. Esta técnica consiste en sembrar, por estriado, tubos pico flauta con medio solido LB.

Luego de sembrar los tubos, se colocaron en estufa a 29°C. Una vez desarrollados, se cubrieron con film plástico y se guardaron en heladera a una temperatura de 4°C.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Aislamiento de bacterias biodegradadoras de Imazapir

A partir de los suelos provenientes de las localidades de Doblas, Embajador Martini, Uriburu y Metileo, se obtuvieron 11 aislamientos, especificados en la tabla 6. Es de destacar que no se pudieron aislar biodegradadores de Imazapir de los suelos de Doblas.

**Tabla 6:** Aislamientos de bacterias biodegradadoras de Imazapir

Suelos	Aislamientos
Embajador Martini	M11
	M12
	M13
	M24
	M25
Uriburu	U110-1
	U1821
	U1231
	U1311
	U2711
Metileo	MT23

Los aislamientos M12, M13 fueron obtenidos a partir de una alícuota de suelo crecidos en medio líquido IMAN. El resto de los aislamientos fueron obtenidos de medio líquido IMACN. Posteriormente una alícuota de 1 ml fue colocada en medio sólido IMACN.



Hasta ahora, muy pocos microorganismos aislados de suelos de distintas características capaces de degradar los herbicidas Imidazolinonas, se han documentado (Xing et al., 2009). Las siguientes cepas degradadoras han sido informadas por distintos investigadores: *Pseudomona fluorescens biotype II. ZJX-5* y *Bacillus cereus ZJX-9* (Xuedong et al., 2005); *Pseudomona sp. IM-4* (Xing et al., 2009); *Crystallopoietes arthrobacter WWX-1* (Xuedong et al., 2007); *Streptomyces PSI/5* (Shelton et al., 1996).

## 5.2. Tinción gram

Los aislamientos fueron caracterizados mediante tinción gram. Los resultados están presentados en la tabla 7; donde también se describen características de la morfología bacteriana a nivel microscópico.

**Tabla7:** Tinción Gram

Aislamiento	Tinción gram	Característica microscópica
M11	Gram -	Cocos
M12	Gram+	Cocos
M13	Gram -	Bacilos
M24	Gram +	Cocos
M25	Gram +	Cocos
U110-1	Gram -	Bacilos
U1821	Gram -	Bacilos
U1231	Gram +	Cocos
U1311	Gram -	Bacilos
U2711	Gram +	Cocos
Mt2 3	Gram -	Cocos

En la bibliografía se hallaron cepas biodegradadoras de diversos herbicidas. Entre las gram negativas se pueden mencionar las siguientes: *Pseudomona sp. IM-4* degradadora de

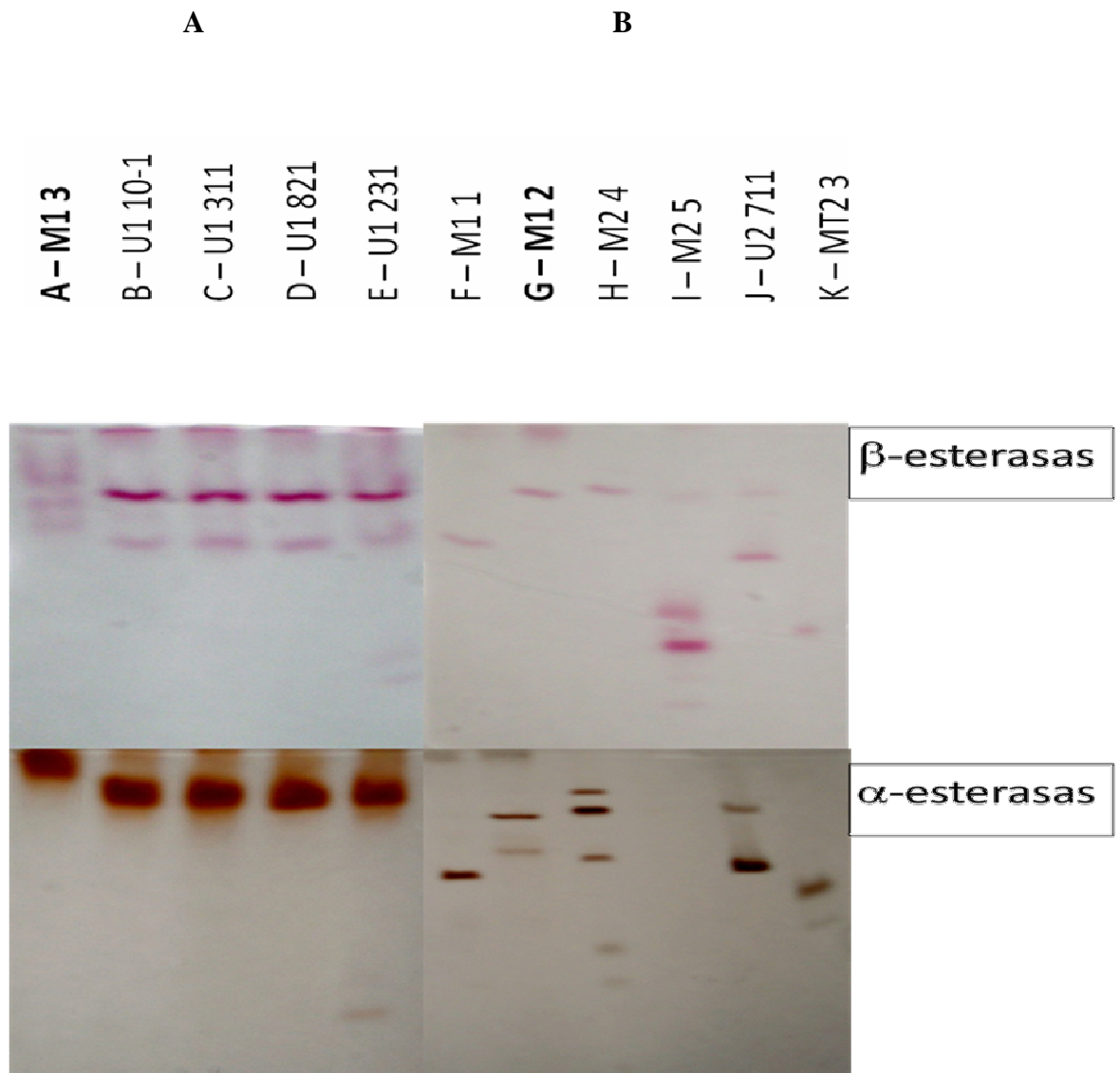
Imazapir, Imazetapir, Imazapic e Imazamox (Xing et al. 2009), un aislamiento degradador de 2,4-diclorofenol (DCP), 4-cloro-2-metilfenol (MCP) y 4-clorofenol (4-CP) (Müller et al. ,1998), *Methylophila sp.*S113 capaz de degradar metsulfurón-metil (Huang et al. 2007). Entre las gram positivas podemos mencionar seis microorganismos capaces de degradar atrazina los cuales pertenecen a los géneros *Nocardioides* y *Arthrobacter* (Vibber et al., 2007).

Cabe destacar que en la mayoría de las cepas halladas en la bibliografía son gram negativas. En el presente trabajo se ha logrado aislar biodegradadores de Imazapir de ambos tipos. No obstante las cepas encontradas en bibliografía han sido caracterizadas y referenciadas con mayor rigor y son producto de una selección exhaustiva.

### **5.3. Diferenciación de los aislamientos de bacterias biodegradadoras de Imazapir por medio de la técnica electroforesis de isoenzimas (M.L.E.E.)**

La caracterización bioquímica de los aislamientos biodegradadores de Imazapir se realizó mediante la técnica MLEE para determinar perfiles diferenciales de isoenzimas  $\alpha$  y  $\beta$  esterases. Mediante dicha técnica se pudo determinar 9 perfiles diferenciales de 11 aislamientos obtenidos. Los aislamientos U110-1, U1311 y U1821 no mostraron diferencias en el perfil de bandas, en tanto que el resto de los aislamientos mostraron perfiles diferentes, incluyendo el aislamiento identificado como M25 que no contiene ninguna banda de  $\alpha$  esterasa.

Se observó una diferencia en el tiempo de revelación de los geles de poliacrilamida por lo cual se realizó la tinción por separado. Los aislamientos de tiempo de revelado rápido están presentados en la figura 2a. En tanto que los de revelado lento están en la figura 2 b.



**Fig. 2:** Electroforesis de isoenzimas (M.L.E.E). A) Aislamientos de revelación rápida y B) Aislamientos de revelación lenta.

En el presente trabajo se realizó electroforesis de isoenzimas para diferenciar aislamientos degradadores de Imazapir. Si bien en la bibliografía no se encontró información sobre el uso de esta metodología para bacterias biodegradadoras, ha sido ampliamente utilizada en análisis de aislamientos nativos de microorganismos con otro tipo de funciones principalmente bacterias fijadoras de nitrógeno y en los últimos años para microorganismos con otras propiedades de promoción de crecimiento (Engvild, et al. 1985; Kober, et al. 2004, Ferreyra, et al. 2008).

## 5.4. Curvas de crecimiento de aislamientos biodegradadores de Imazapir

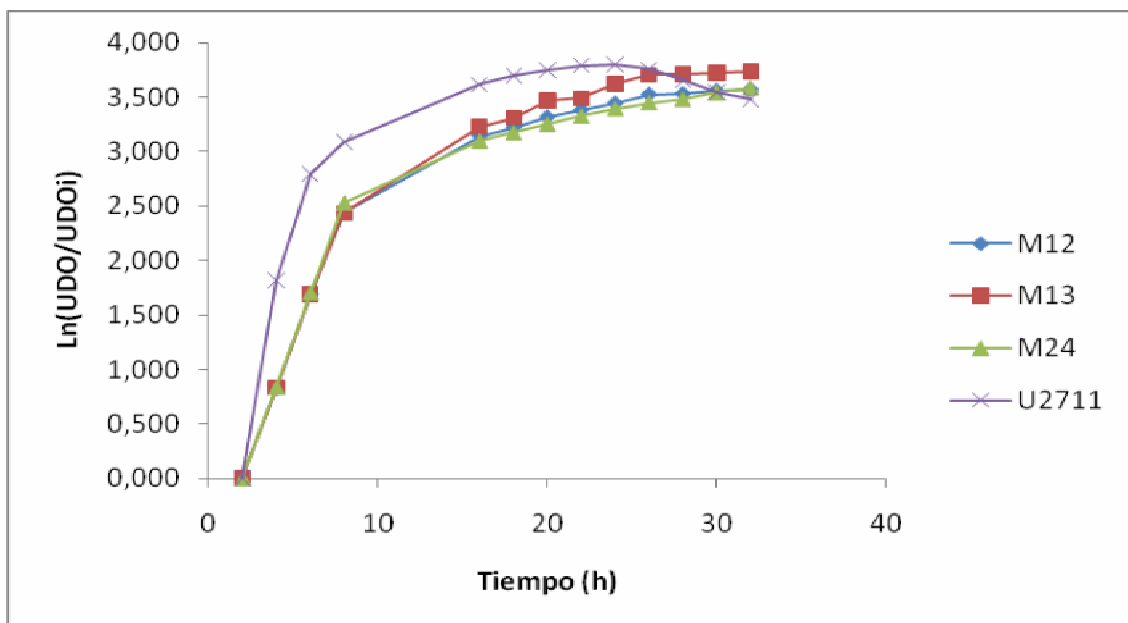
### 5.4.1. Curvas de crecimiento en medio LB

El hecho de realizar un control de crecimiento y desarrollo de biomasa microbiana con objeto de determinar parámetros como  $\mu$  y  $\theta_g$  tiene gran importancia si se considera su aplicación en biotecnología (Balatti, et al. 1996).

Las curvas en medio LB se realizaron con los aislamientos M12, M13 y M24 y U2711, los cuales fueron elegidos al azar.

Al analizar las curvas de crecimiento logarítmicas (figura 3) se puede percibir que el aislamiento U2711 posee una mayor pendiente en la fase de crecimiento exponencial que los demás aislamientos, por tanto tiene una mayor  $\mu$  y en consecuencia un menor  $\theta_g$  que el resto. El aislamiento U2711 muestra un crecimiento tal que llega a fase estacionaria a las 20 h y de muerte a las 24 h.

Los aislamientos M12, M13 y M24 alcanzan la fase estacionaria a las 22 h y no entran en fase de muerte en el tiempo evaluado.



**Fig. 3:** Curva de crecimiento logarítmica en medio LB

### Cálculo de las velocidades específicas de crecimiento y de los tiempos de generación

Tales parámetros fueron calculados mediante las siguientes formulas:

$$\mu = (\text{Ln } X/X_0) / t \qquad \theta_g = \text{Ln } 2 / \mu$$

**Nota:**  $\text{Ln } (X/X_0) = \text{Ln } (\text{UDO}/\text{UDO}_0)$  (Madigan, et al. 2004)

El aislamiento U2711 alcanza la mayor velocidad específica de crecimiento celular entre las 2 y las 4 hs de crecimiento del cultivo. En tanto que el resto de los aislamientos M24, M12 y M13 alcanza la mayor velocidad específica de crecimiento entre las 4y 6 horas.

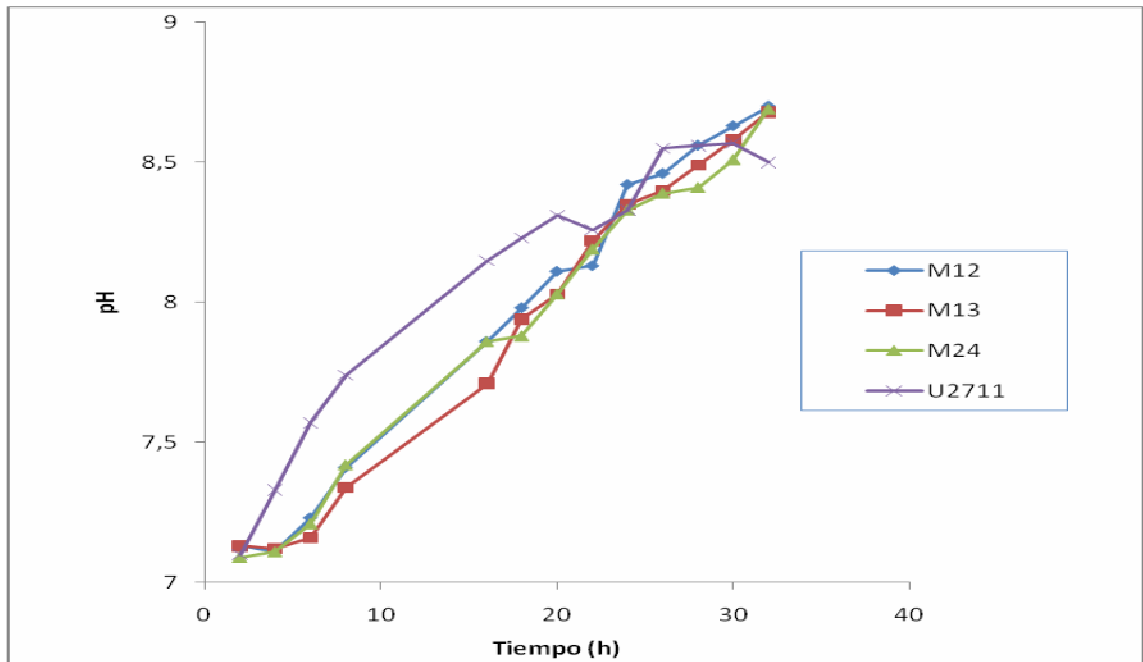
Consecuentemente el menor tiempo de generación se dio entre las 2 y las 4 hs para el aislamiento U2711y entre las 4 y las 6 hs para el resto de los aislamientos.

**Tabla 8:** Valores de velocidad específica de crecimiento máxima y tiempo de generación para cada aislamiento.

M12	M13	M24	U2711
$\mu = 0,418 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,419 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,424 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,910 \text{ h}^{-1}$
$\theta = 1,658 \text{ h}$	$\theta = 1,655 \text{ h}$	$\theta = 1,638 \text{ h}$	$\theta = 0,762 \text{ h}$

Con respecto a las curvas de pH en medio LB (figura 4) se percibe un aumento de éste en todos los aislamientos. El crecimiento en la fase exponencial del aislamiento U2711 se da a un pH superior que en el resto de los aislamientos.

Se observa que el aislamiento U2711 alcanza un pH de 8,25 a las 20 hs de crecimiento, en tanto que el resto alcanza ese valor de pH a las 24 hs. La llegada del pH a ese valor coincide para todos los aislamientos con la entrada en fase estacionaria.



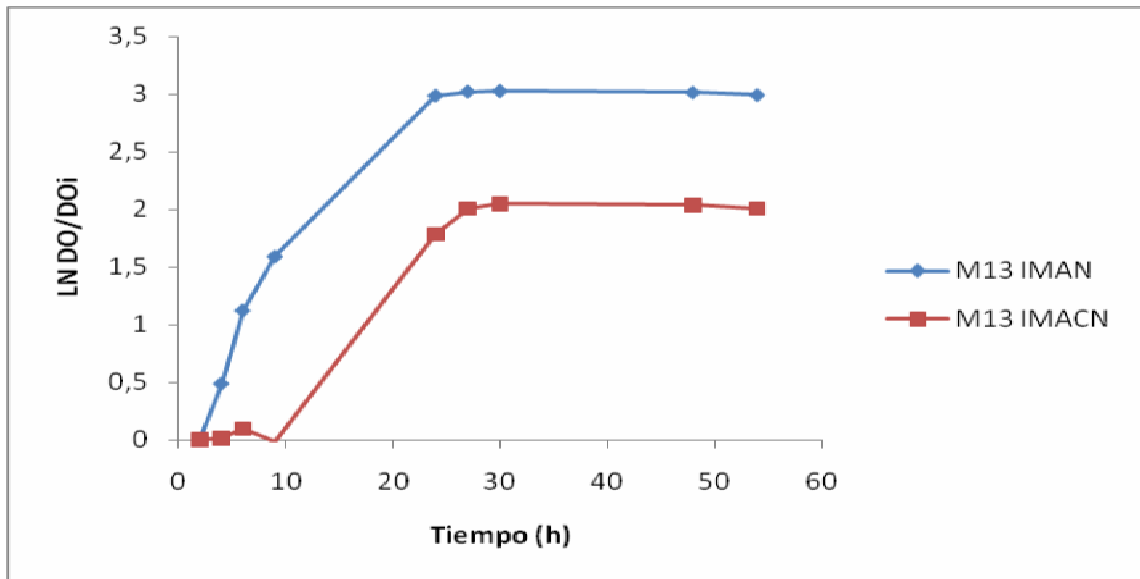
**Fig. 4:** Curvas de pH en medio LB

En el presente trabajo se observó que, en general, el pH del medio en el cual crecieron los aislamientos en LB aumentó conforme al crecimiento del cultivo. Según bibliografía, la cepa *Pseudomonas oleovorans* ACL2 (biodegradador de acetoclor) creciendo en medio LB adicionado de Acetoclor siguió el mismo comportamiento siendo el pH óptimo de crecimiento cercano a 8 (Xu, et al 2006).

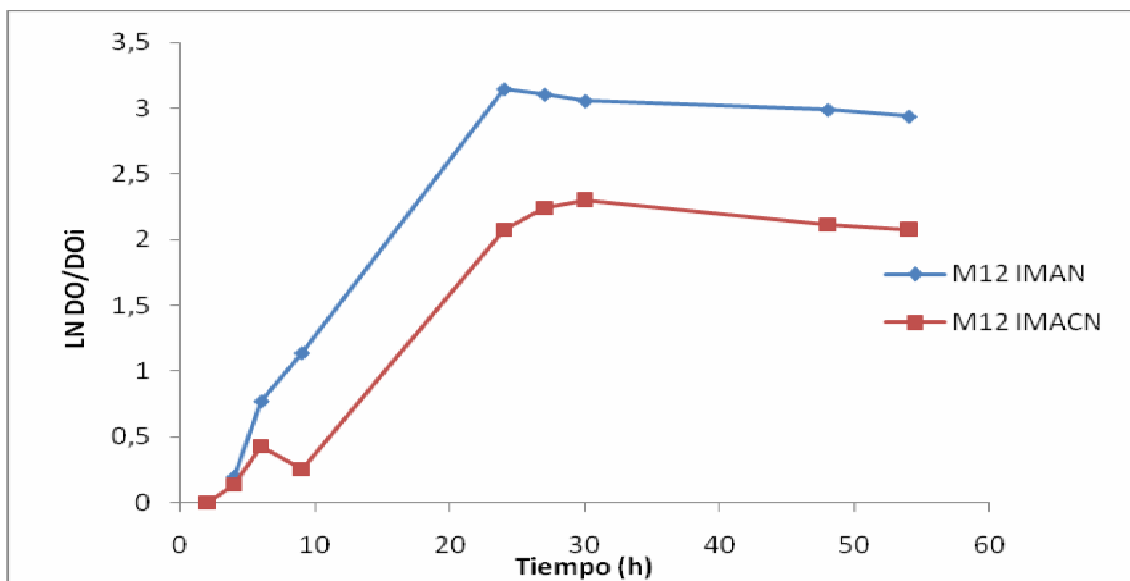
#### 5.4.2. Curvas de crecimiento en medio IMACN e IMAN

Los aislamientos M13 (figura 5), M12 (figura 6) y M24 (figura 7) alcanzan la mayor velocidad específica de crecimiento y consecuentemente el menor tiempo de generación a las 6 hs de crecimiento del cultivo (tabla 9).

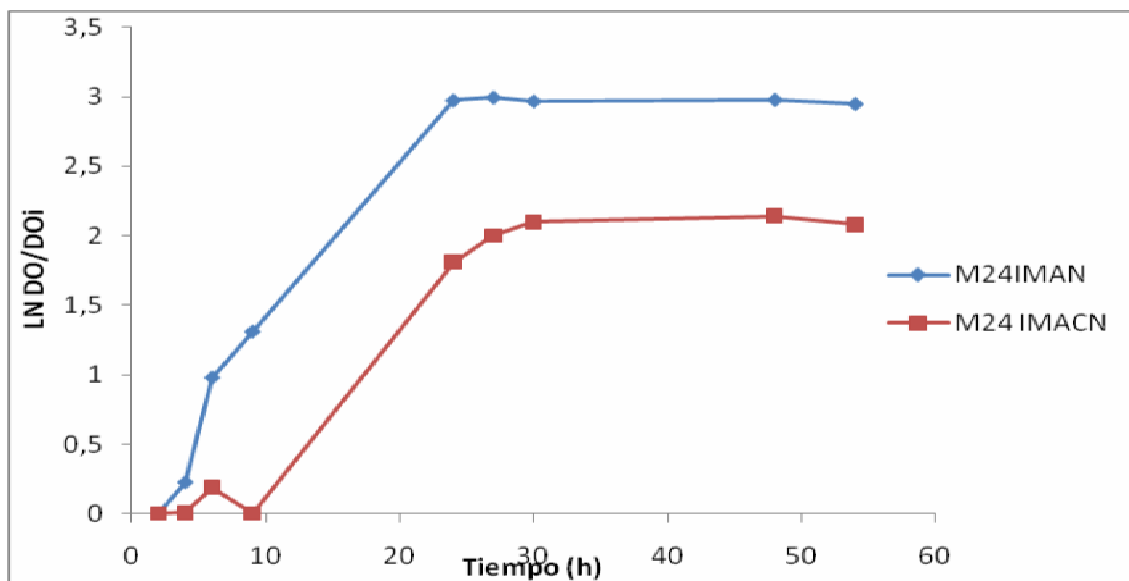
El aislamiento U2711 no mostró un buen crecimiento en medio IMACN e IMAN por lo cual las curvas no fueron presentadas.



**Fig. 5:** Curva de crecimiento logarítmica en medio IMAN e IMACN del aislamiento M13



**Fig. 6:** Curva de crecimiento logarítmica en medio IMAN e IMACN del aislamiento M12



**Fig. 7:** Curva de crecimiento logarítmica en medio IMAN e IMACN del aislamiento M24

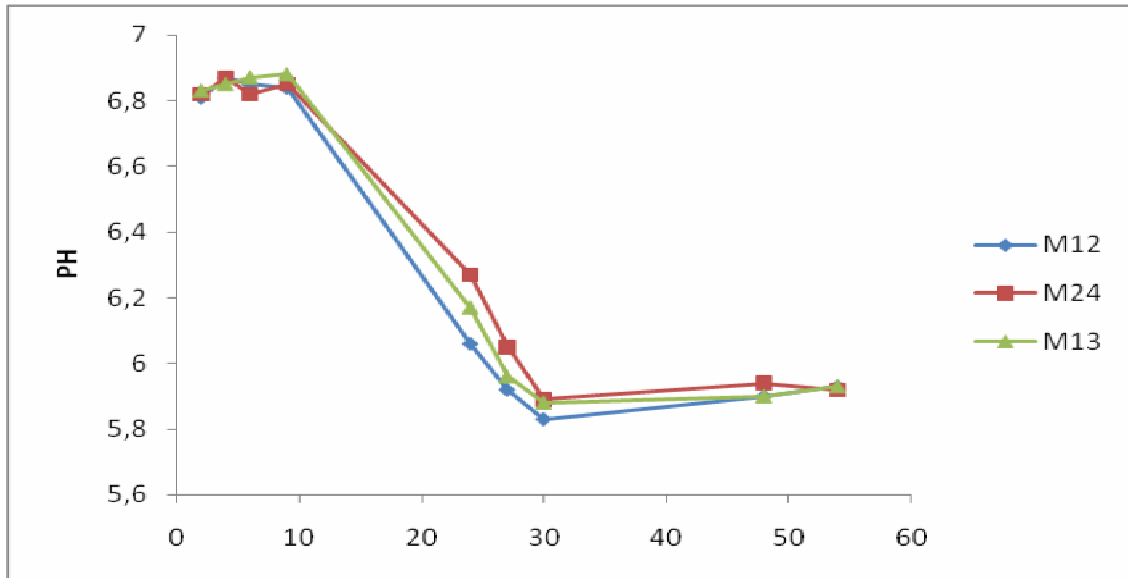
**Tabla 9:** Valores de de velocidad específica de crecimiento y tiempo de generación

	M12	M13	M24
IMACN	$\mu = 0,061 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,023 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,04 \text{ h}^{-1}$
	$\theta = 11,288 \text{ h}$	$\theta = 29,517 \text{ h}$	$\theta = 14,565 \text{ h}$
IMAN	$\mu = 0,192 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,281 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,244 \text{ h}^{-1}$
	$\theta = 3,606 \text{ h}$	$\theta = 2,467 \text{ h}$	$\theta = 2,838 \text{ h}$

Los aislamientos desarrollados en medio IMACN presentaron una velocidad de crecimiento menor a la obtenida con el medio IMAN. Los resultados obtenidos con este trabajo coinciden con el estudio realizado por Xing et al. (2009) quien observó que la velocidad de crecimiento de la cepa *Pseudomona sp.* IM-4 degradadora de Imazetapir, está relacionada con el medio de cultivo utilizado. Cuando se utiliza imazetapir como fuente de carbono y nitrógeno la degradación es más lenta que cuando se utiliza solamente como fuente de nitrógeno (Xing et al. 2009).

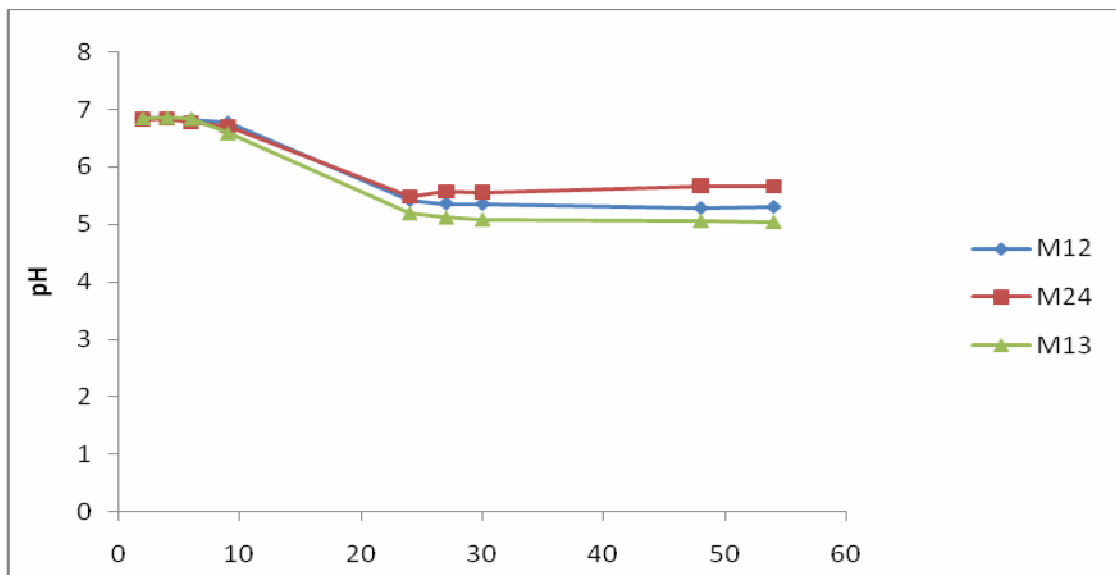


La figura 8 muestra que el pH disminuye desde un valor 6.82 hasta un valor 5.83 para el aislamiento M12, hasta un valor 5.86 para el aislamiento M24 y hasta un valor 5.88 para el aislamiento M13.



**Fig. 8:** Curvas de pH en medio IMACN

Se puede visualizar en la figura 9 que en medio IMAN la disminución de pH es menor que en medio IMACN.



**Fig. 9:** Curvas de pH en medio IMAN

Con respecto a las curvas de pH en medio IMACN se observó una disminución de pH a lo largo del crecimiento, contrario a lo que sucede en medio LB lo cual puede indicar que

estos aislamientos en este medio tienen un crecimiento óptimo a pH bajo. Un estudio realizado por Ding et al. (2008) informó que la cepa *Alcaligenes sp.* BH-1 degrada completamente el Imazetapir (herbicida perteneciente a la misma familia que Imazapir) a pH 5 y solamente el 50% a pH 8-9. (Ding et al.2008) Se observa que las cepas metabolizan mejor el herbicida a pH bajo por lo tanto es de suponer que si la bacteria acidifica el medio es para aprovechar mejor la fuente de carbono.

### 5.5. Ensayo en cámara climatizada con plantas de Alfalfa (*Medicago Sativa*)

Los dos primeros ensayos fueron realizados con los aislamientos presentados en la tabla 10. El tercer ensayo fue realizado con los aislamientos presentados en la tabla 11.

**Tabla 10:** Aislamientos utilizados en el ensayo en cámara n° 1 y 2

<b>Localidad</b>	<b>Aislamiento</b>
<b>Metileo</b>	M11
	M12
	M13
	M24
	M25
<b>Uriburu</b>	U1311
	U2711

**Tabla 11:** Aislamientos utilizados en el ensayo en cámara n° 3

<b>Metileo</b>	M12
	M13
	M24
<b>Uriburu</b>	U110-1
	U2711

Se realizaron tres ensayos en cámara con el objetivo de evaluar diferentes concentraciones de inóculo en plántulas de alfalfa. En los dos primeros se hizo una evaluación semicuantitativa respecto de la cantidad de inóculo agregado en la inoculación y en el tercero una evaluación cuantitativa. Todos los ensayos fueron comparados con un testigo sin inocular, realizándose 4 repeticiones por tratamiento.

#### **5.5.1. Primer ensayo: inoculación de plantas de alfalfa con alta concentración de inóculo**

Se evaluó el efecto de alta concentración de inóculo. Para ello las plantas fueron inoculadas con 1 ml de medio sin diluir.

En la tabla 12 se muestra que los efectos deletéreos de la inoculación con bacterias biodegradadoras de Imazapir son más evidentes en la raíz que en la parte aérea. Esto es debido a que solo dos de los nueve tratamientos tuvieron diferencias significativas de peso seco de parte aérea con respecto al testigo (M12 y M13), en tanto que 5 de los nueve tratamientos realizados disminuye significativamente el crecimiento de la raíz en comparación al testigo.

**Tabla 12:** Ensayo en cámara con plántulas de alfalfa expuestas a alta concentración de inóculo. Letras diferentes expresan diferencias significativas según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Peso seco parte aérea		Peso seco raíz	
Testigo	0,021 ± 0,002	A	0,0028 ± 0,0006	AB
M11	0,020 ± 0,005	AB	<b>0,0015 ± 0,0005</b>	<b>C</b>
M12	<b>0,012 ± 0,003</b>	<b>BC</b>	<b>0,0013 ± 0,0003</b>	<b>C</b>
M13	<b>0,007 ± 0,002</b>	<b>C</b>	<b>0,0014 ± 0,0003</b>	<b>C</b>
M24	0,017 ± 0,005	AB	0,0031 ± 0,0003	A
M25	0,017 ± 0,001	AB	0,0026 ± 0,0003	AB
U1101	0,017 ± 0,004	AB	0,0019 ± 0,0003	BC
U1231	0,016 ± 0,003	AB	0,0029 ± 0,0005	AB
U1311	0,018 ± 0,005	AB	<b>0,0010 ± 0,0002</b>	<b>C</b>
U2711	0,017 ± 0,003	AB	<b>0,0014 ± 0,0003</b>	<b>C</b>

### 5.5.2. Segundo ensayo: inoculación de plantas de alfalfa con baja concentración de inóculo

Utilizando alta concentración de inóculo (inóculo sin diluir) se obtuvieron efectos deletéreos en la mayoría de los tratamientos. No obstante, se decidió realizar un segundo ensayo para determinar si se mantenían dichos efectos, utilizando baja concentración de inóculo, para lo cual se realizaron las diluciones apropiadas hasta obtener una densidad óptica en el rango de absorbancia 0.5-1.0.

Se puede observar en la tabla 13 que no hay diferencias significativas entre los valores de peso seco de parte aérea. En los valores de peso seco de raíz el aislamiento M24 muestra diferencia significativa con el testigo, siendo el valor obtenido para la planta inoculada significativamente mayor que el obtenido con éste.

**Tabla 13:** Ensayo en cámara con plántulas de alfalfa expuestas a baja concentración de inóculo. Letras diferentes expresan diferencias significativas según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Peso seco parte aérea		Peso seco raíz	
Testigo	0,030 ± 0,004	A	0,0049 ± 0,0005	BC
M11	0,039 ± 0,002	A	0,0062 ± 0,0004	AB
M12	0,038 ± 0,006	A	0,0053 ± 0,0006	ABC
M13	0,034 ± 0,002	A	0,0044 ± 0,0009	BC
M24	0,037 ± 0,002	A	0,0071 ± 0,0010	A
M25	0,035 ± 0,006	A	0,0056 ± 0,0010	ABC
U110-1	0,034 ± 0,003	A	0,0062 ± 0,0007	AB
U1231	0,034 ± 0,005	A	0,0050 ± 0,0010	BC
U1311	0,035 ± 0,005	A	0,0055 ± 0,0010	ABC
U2711	0,035 ± 0,005	A	0,0042 ± 0,0005	C

La realización de ambos ensayos dio evidencias de que los efectos deletéreos observados en las plantas se dan en función de la concentración de inóculo utilizada.

### **5.5.3. Tercer ensayo: inoculación de plantas de alfalfa con distintas diluciones de inóculo**

En consecuencia se realizó un tercer ensayo utilizando distintas diluciones de inóculo. Fueron evaluados 5 aislamientos donde se inocularon plantas con cultivos de bacterias sin diluir y diluciones de  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  del mismo. Para que el inóculo fuera cuantitativamente válido se realizó recuento de bacterias a través del método de diluciones seriadas.

En la tabla 14 se pueden observar la concentración celular presente en el tubo Jensen (conteniendo 20 ml de medio).

**Tabla 14:** Concentración de bacterias en medio Jensen luego de la inoculación.

Aislamientos	Inoculo concentrado (Bacterias x ml <sup>-1</sup> )	Dilución 10 <sup>-2</sup> (Bacterias x ml <sup>-1</sup> )	Dilución 10 <sup>-4</sup> (Bacterias x ml <sup>-1</sup> )
M12	2,5E+12	2,5E+10	2,5E+08
M13	5E+12	5E+10	5E+08
M24	1,5E+13	1,5E+11	1,5E+09
U110-1	4E+12	4E+10	4E+08
U2711	5E+12	5E+10	5E+08

Se trabajó con 5 aislamientos los cuales fueron elegidos teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

M12 y M13 produjeron una disminución significativa en el peso seco de parte aérea y raíz en el ensayo con alta concentración de inoculo.

U2711 generó una disminución significativa del peso seco raíz en el ensayo con alta concentración de inoculo.

M24 generó un aumento en el peso de raíz en el ensayo con baja concentración de inoculo.

U110-1 no generó efectos deletéreos en ninguno de los dos ensayos anteriores.

Se puede visualizar en la tabla 15 que ninguno de los aislamientos posee diferencias significativas de peso seco de parte aérea con el testigo.

En tanto que en raíz se observaron diferencias entre tratamientos. En primer lugar todos los tratamientos inoculados con cultivos sin diluir tuvieron un valor de peso seco significativamente menor respecto al testigo. La inoculación con el aislamiento M12 tuvo además diferencias significativas con el testigo en los tratamientos con diluciones 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-4</sup>, y el tratamiento con inoculo U110-1 con dilución 10<sup>-2</sup> evidenció el mismo comportamiento.

Esto implica que el aislamiento M12 estaría provocando un efecto fitotóxico que se reflejó en una disminución importante en el desarrollo de la raíz. El aislamiento U110-1 también provocaría el mismo efecto pero con menor intensidad.

**Tabla 15:** Ensayo en cámara con plántulas de alfalfa expuestas a diferente concentración de inoculo. Letras diferentes expresan diferencias significativas según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Peso seco parte aérea		Peso seco raíz	
Testigo	0,028 ± 0,002	BAC	0,0056 ± 0,0006	A
M12C	0,026 ± 0,002	BAC	0,0028 ± 0,0006	EF
M12-2	0,033 ± 0,006	A	0,0038 ± 0,0010	BCDEF
M12-4	0,028 ± 0,004	BAC	0,0025 ± 0,0006	F
M13C	0,027 ± 0,004	BAC	0,0033 ± 0,0007	BCDEF
M13-2	0,023 ± 0,002	C	0,0039 ± 0,0008	ABCDEF
M13-4	0,025 ± 0,003	BAC	0,0045 ± 0,0007	ABCD
M24C	0,023 ± 0,005	BC	0,0029 ± 0,0005	DEF
M24-2	0,028 ± 0,003	BAC	0,0042 ± 0,0008	ABCDEF
M24-4	0,028 ± 0,004	BAC	0,0047 ± 0,0010	ABC
U110-1C	0,032 ± 0,006	BA	0,0031 ± 0,0004	CDEF
U110-1-2	0,026 ± 0,002	BAC	0,0036 ± 0,0004	BCDEF
U110-1-4	0,023 ± 0,002	BC	0,0045 ± 0,0005	ABCDE
U2711C	0,026 ± 0,002	BAC	0,0031 ± 0,0004	CDEF
U2711-2	0,033 ± 0,004	A	0,0049 ± 0,0007	AB
U2711-4	0,025 ± 0,004	BAC	0,0044 ± 0,0005	ABCDE

## 6. CONCLUSION

- Los aislamientos biodegradadores de Imazapir estudiados, muestran una diferencia en el crecimiento dependiendo del medio de cultivo utilizado. Se observa un menor crecimiento de los aislamientos para las curvas realizadas en medio IMACN lo que es de esperarse dado que las bacterias extraen más difícilmente la fuente de carbono y nitrógeno.
- Las curvas de pH realizadas muestran que en general este tipo de aislamientos producen un aumento de pH cuando se utiliza LB como medio de crecimiento y una disminución del mismo cuando se utiliza como fuente de carbono y nitrógeno Imazapir.
- La electroforesis de isoenzimas (M.L.E.E.) realizada fue determinante para poder diferenciar los aislamientos entre sí. El criterio basado en la discriminación de aislamientos a partir de sus perfiles diferenciales de  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas parece ser suficiente para caracterizar los aislamientos y utilizarlos para evaluar efectos deletéreos en las plantas.
- En relación a los ensayos en cámara realizados se concluye que se obtuvieron aislamientos que generan efectos deletéreos en la raíz. Esto se observó en el aislamiento M12 que muestra una disminución importante en el desarrollo de la raíz. El aislamiento U110-1 también provoca el mismo efecto pero con menor intensidad.
- Los efectos deletéreos observados en el ensayo en cámara se dan en función de la concentración de inóculo utilizada.



- Si bien se cumplió el objetivo del trabajo de aislar bacterias degradadoras que usaran como fuente de carbono y nitrógeno el herbicida Imazapir, por los ensayos realizados en cámara donde se evaluó el efecto fitotóxico deben iniciarse estudios respecto de la inoculación masiva de estas bacterias utilizadas como biodegradadoras, dado que su excesiva proliferación podría redundar en efectos secundarios de elevada fitotoxicidad en el suelo.

## 7. BIBLIOGRAFIA

AMERICAN CYANAMID. **Arsenal herbicide: technical report**. American Cyanamid Agricultural Division. Madison, New Jersey 1986.

ARAUZ CAVALLINI, L. F. **Fitopatología un enfoque agroecológico**. San José, Costa Rica. Editorial de la universidad de Costa Rica. 467 p. 1998

ASHTON, F.M.; MONACO, T. **Weed science**. Principles and Practices. 3° ed. A Wiley-interscience publication. John Wiley & Sons, inc. New York. Chichester. Brisbane. Toronto. Singapore. 466 p. 1991.

AZZOUZI, E.; DAHCHOUR, M.; BOUHOUSS, A.; FERHAT, M. **Study on the behavior of imazapyr in two Moroccan soils**. Weed Research. 38:217-220. 1998.

BAILEY, K.L. **IPM Practices for reducing fungicide use in field crops**. In: Pimentel, D. (Ed.). Techniques for reducing pesticide use. Wiley & Sons Ltd. EE.UU. Chapter 14: 293-316. 1997.

BALATTI, A.P.; FREIRE, J.R. Legume Inoculants. Selection and characterization of strains. Production, use and management. Ed. Kingraf .148p. 1996

BALBA, M.T; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. **Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation**. Journal of Microbiological Methods 32: 155–164. 1998

CASELEY, J.C. **Herbicidas**. In: LABRADA, R.; CASELEY, J.C.; PARKER, C. (Eds.) Manejo de malezas para países en desarrollo. (Estudio FAO producción y protección vegetal). Roma. 1996. Cap. 10. <http://www.fao.org/docrep/t1147s/t1147s00.htm#Contents>. [Acceso: 14/09/2010]

COOK, J. L.; BAUMANN, P.; JACKMAN, J. A.; STEVENSON, D. **Pesticides Characteristics that Affect Water Quality**. Farm Chemicals Handbook`95, Meister Publishing Co, Willoughby.429 pp, 1995.

COMFORT, S.D.; SHEA, P.J.; ROETH, F.W. **Understanding pesticides and water quality in Nebraska**. Nebraska Co-operative Extension EC 94-135, USA. 16p. 1994.

CRUZ-GUZMAN ALCALA, M. **La contaminación de suelos y aguas. Su prevención con nuevas sustancias naturales**. Universidad de Sevilla. 244 p. 2007

DICKENS, R.; WEHTJE, G. **Mobility and soil solution characteristics of imazapyr (Arsenal) and sulfometuron methyl (Oust) in Alabama soils**. Proceedings of the Southern Weed Science Society. 39:368. 1986.

DING, W.; BAI, H; CHENG, Z; QU, J.J.; XU, W.J. **Isolation and identification of imazethapyr degradable bacteria and its degradation characteristics**. Huan Jing Ke Xue 29:1359–1362. 2008

DOWELL, M.; CONDRON, R.W.L.; MAIN, B.E.; DASTGHEIB, F. **Dissipation of imazapyr, flumetsulam and thifensulfuron in soil**. Weed Research. 37:381-389. 1997.

ELLIS, L.B.M.; ROE, D.; WACKETT, L.P. **The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: the first decade.** Nucleic Acids Research 34:517–521. 2006

ENGVILD, K. C.; NIELSEN, G. **Strain identification in Rhizobium by starch gel electrophoresis of isoenzymes.** Plant and Soil. 87 (2): 251-256. 1985

ESPINOZA, G.; MORALES, J. **Catalogo de herbicidas, Zafra 2008/2009.** Guatemala, CENGICANÑA. 2009

FERREYRA,P.; GARCIA,P.; AZCARATE,S., OMBRONI,M.,RONCHI,A.,GRASSANO, A. **Preliminary results of studies of symbionts of Lotus and their association with solubilising of phosphate bacteria.** Lotus Newsletter .Volume 38 (2), 46-48.2008

GU, L.F; JIANG, J.D.; LI, X.H.; SHINA,WAR, W.A.; LI, S.P. **Biodegradation of ethametsulfuron-methyl by Pseudomonas sp. SW4 isolated from contaminated soil.** Curr Microbiol 55:420–426. 2007

HAGER, A.; SPRAGUE, C.; MC GLAMERY, M. **Factors affecting herbicide persistence.** Agricultural pest management handbook. Illinois. 323-326. 2000

HANCE, R.J; HOLLY, K. **Weed control handbook principles.** 8° ed. Blackwell Scientific publications. Oxford London Edinburgh. Boston Melbourne. 582 p. 1990.

HART, R.G.; BHALLA, P.; HACKETT, N.M.; LIGNOWSDI, M.**Imazethapyr herbicide.** In: DALE L.SHANER AND SUSAN. O'CONNOR (Eds). The imidazoline herbicides CRC Press. 20: 247-256. 1991

HELLING, C. S., KEARNEY, P. C.; ALEXANDER, M. **Behavior of pesticides in soil.** *Advances in Agronomy.* 23:147-240. 1971.

HUANG, X, ÉL, J, SUN, Q.; PAN, P.; SUN, X.; LI, S. **Isolation and characterization of a metsulfuron-methyl degrading bacterium *Methylopila* sp. S113.** *International Biodeterioration & Biodegradation.* Volume 60, 3:152-158. 2007

ILYINA A., CASTILLO SANCHEZ M.I., VILLARREAL SANCHEZ J. A., RAMIREZ ESQUIVEL G., CANDELAS RAMIREZ J. **Isolation of soil bacteria for bioremediation of hydrocarbon contamination.** *Moscow University Chemistry Bulletin.*44 (1):88-91 2003

ISTILART, C. **Residualidad de imidazolinonas sobre cereales de invierno.** *Inta. Chacra experimental integrada Barrow.* 2002

JENSEN, H.L. **Decomposition of chlorosubstituted aliphatic acids by soil bacteria.** *Canadian Journal of Microbiology.* 3:151–164. 1952.

JOHNSEN, K.; JACOBSEN, C.S.; TORSVIK, V.; SØRENSEN, J. **Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review.** *Biology and Fertility of Soils.* 33:443–453. 2001.

KARPOUZAS; D.G.; WALKER, A. **Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* epI to degrade ethoprophos in soil.** *Soil Biology & Biochemistry.* 32:1753–1762. 2000

KERR, L.M.; MARCHESI, J.R. **Isolation of novel bacteria able to degrade a-halocarboxylic acids by enrichment from environmental samples.** *Chemosphere* 64: 848–855. 2006.

KOBER, M; SACCOL, D.E.; SÁ, E.L.; FREIRE, J.R.J; GIONGO, A. **Characterization of variants of Bradyrhizobium elkanii and B. japonicum and symbiotic behaviour in soybeans.** Ciencia Rural 34(5):1459-1464. 2004

LOUX, M. M.; LIEBL, R. A.; SLIFE, F. W. **Availability and persistence and carryover of imidazolinone herbicides.** Weed Technology., 7, 452-458. 1989

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Brock **Biología de los microorganismos.** 10<sup>a</sup> ed. Ed. Pearson Educacion, S.A.Cap 6:142-144. 2004

MAGEE LA, COLMER AR. **Decomposition of 2, 2-dichloropropionic acid by soil bacteria.** Canadian Journal of Microbiology. 5: 255-260. 1959.

MALLIPUDI, N. M.; STOUT, S.J.; DACUNHA, A.R; LEE, A.H. **Photolysis of imazapyr (AC 243997) herbicide in aqueous media.** J. Agricultural and Food Chemistry. 39(2): 412-417. 1991.

MANGELS, G. **Behaviour of the imidazolinone herbicides in soil-a review of the literature.** In: SHANER, D.L. AND O'CONNOR, S.L. (Eds). The Imidazolinone Herbicides. Boca Raton, FL:CRC press. pp. 191-209.1991

MINOGUE, P.J.; DITOMASO,J.M.; BAILEY, B.G.; FREDRICKSON, K. **Imazapyr, A New Tool for Forest Site Preparation in California: A Two-Year Program Report for a Multilocation Study of Imazapyr Rate, Application Timing and Conifer Planting Timing Across Varying Precipitation Regimes.** Proceedings of the California Weed Science Society 52:130-140. 2000

MÜLLER, R.H.; JORKS, S.; KLEINSTEUBER, S.; BABEL, W. **Degradation of various chlorophenols under alkaline conditions by Gram-negative bacteria closely related to *Ochrobactrum anthropi***. Journal of Basic Microbiology 38(4):269-281. 1998

PENFOLD, W.J. **The inhibitory selective action on bacteria of bodies related to monochloroacetic acid**. Journal of Hygiene. 13:35-48.1913.

PEOPLES, T. R. **Arsenal herbicide (AC 252,925): a development overview**. Proceedings Southern Weed Science Society 37:378-387. 1984.

PUSINO, A.; PETRETTO, S.; GESSA, C. **Adsorption and desorption of imazapyr by soil**. Journal of Agricultural and Food Chemistry.45 (3): 1012-1016. 1997.

RUBIN, L. **Imazapyr (Arsenal, Chopper, and Stalker Formulations)**.Final Report to the USDA, Forest Service SERA TR 98-21-14-01b. 1999

RUBIN, L. **Imazapyr – Human Health and Ecological Risk Assessment**.Final Report to the USDA, Forest Service SERA TR 04-43-17-05b.2004

SHANER, D. L., ANDERSON, P. C.; STIDHAM, M. A. **Imidazolinones - potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase**. Plant Physiol. 76:545-546. 1984

SHANER, D.L.; SINGH, B.K. **How does inhibition of amino acid biosynthesis kill plants?** In: Singh BK, Flores HE, Shannon JC (Eds) Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Md.pp 174–183. 1992

SHANER, D. L., MALLIPUDI N.M. **Mechanisms of selectivity of the imidazolinone herbicides.** Chpt 7 in *The Imidazolinone Herbicides*, D.L. Shaner and S. L. O'Connor, Eds. CRC Press. Boca Raton, FL. 290 pp. 1991.

SHELTON, D.R.; KHADER, S.; KARNS, J.S; POGELL, B.M. **Metabolism of twelve herbicides by Streptomyces.** *Biodegradation* 7:129-136. 1996

SREENIVASULU, C.; APARNA, Y. **Bioremediation of Methyl parathion by Free and Immobilized Cells of Bacillus sp. Isolated from Soil.** *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology* 67:98-105. 2001

STOUGAARD, R. N.; SHEA, P. J.; MARTIN, A. R. **Effect of soil type and pH on adsorption, mobility, and efficacy of imazaquin and imazethapyr.** *Weed Science.* 38: 67-73. 1990

STRUTHERS, J.K; JAYACHANDRAN, K.; MOORMAN, T.B. **Biodegradation of atrazine by Agrobacterium radiobacter J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil.** *Applied Environmental Microbiology* 64:3368–3375. 1998

Terralia. Imazapyr. Publicacion on line 2010.

[http://www.terralia.com/agroquimicos\\_de\\_mexico/index.php?proceso=registro&numero=6834](http://www.terralia.com/agroquimicos_de_mexico/index.php?proceso=registro&numero=6834) [ Acceso: 11/03/2011].

TREJOS, P. S. **Determinación de residuos de imazapic e imazapir en arroz (Oriza sativa) por HPLC.** *Ingeniería.* 15(1, 2): 15-19. 2005.

TU, M.; HURD, C.; RANDALL, J.M. **Weed Control Methods Handbook,** Tools and Techniques for Use in Natural Areas. cap 7 H:7 pages. 2001



VENCILL, W.K. **Herbicide Handbook**. WSSA. Weed Science Society of America Champaign, Illinois. 493p. 8<sup>o</sup> ed. USA, Lawrence. 2002

VIBBER, L.L.; PRESSLER, M.J.; COLORES, G.M. **Isolation and characterization of novel atrazine-degrading microorganisms from an agricultural soil**. Applied Microbiology and Biotechnology.75(4): 921-928. 2007

VOLLMER, J. **Personal Communication**. BASF Ecological Restoration Specialist. 2003

VIZANTINOPOULOS, S., LOLOS, P. **Persistence and leaching of the herbicide imazapyr in soil**. Bulletin Environmental Contamination Toxicology. 52:404-410. 1994.

WARE, G.W.; WHITACRE, D.M. **The Pesticide Book, 6<sup>th</sup> Ed**. Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio.496 pp.2004

WEHTJE, G.; DICKENS, R.; WILCUT, J.W.; HAJEK, B.F. **Sorption and mobility of sulfometuron and imazapyr in five Alabama soils**. Weed Science. 35: 858-864. 1987.

WSSA. **Herbicide handbook**. Weed Society of America. Champaign, Illinois. 352 pp. 1994.

XING, H.; JIJIE, P.; BO, L. ;JIQUAN, S.;YANGYANG, Z.; SHUNPENG, L. **Isolation, Characterization of a Strain Capable of Degrading Imazethapyr and Its Use in Degradation of the Herbicide in Soil**. Current Microbiology 59:363–367. 2009

XU, J; QIU, X; DAI, J; YANG, H.C; ZHANG, J; XU, M. **Isolation and characterization of a Pseudomonas oleovorans degrading the chloroacetamide herbicide acetochlor**. Biodegradation 17: 219–225. 2006

XUEDONG,W. ; XIUJUAN,L.; HUILI,W.; QIAOXIANG,D. **Utilization and degradation of imazaquin by a naturally occurring isolate of *Arthrobacter crystallopoietes***. *Chemosphere* 67:2156-2162. 2007

XUEDONG, W.; HUILI, W.; DEFANG, F. **Biodegradation of Imazapyr by free cells of *Pseudomonas fluorescens* Biotype II and *Bacillus Cereus* isolated from soil**. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*. 74:350-355. 2005.

ZANARDINI, E.; ARNOLDI, A.; BOSCHIN, G.; D'AGOSTINA, A.; NEGRI, M.; SORLINI, C. **Degradation pathways of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl by a *Pseudomonas fluorescens* strain**. *Annals of Microbiology*. 52:25–37. 2002.

ZHANG, X. H., ZHANG, G. S., ZHANG, Z. H., XU, J. H., AND LI, S. P. **Isolation and Characterization of a Dichlorvos-Degrading Strain DDV-1 of *Ochrobactrum sp.*** *Pedosphere*. 16(1): 64-71. 2006.