

Universidad de la República

Tesis para obtener el título de Magíster en Biotecnología



# Composición y estabilidad de

## consorcios de bacterias degradadoras de

## atrazina provenientes de plantas

# potabilizadoras de agua



## Laura Pinelli Schmidt

Orientadora: Dra. Ana Fernández Scavino

Tribunal: Dra. Ángela Cabezas, Dra. Andrea Villarino, Dra. Silvana Vero

Realizado en: Laboratorio de Ecología Microbiana Medioambiental, Facultad de Química, UdelaR.

Montevideo, diciembre 2015

## Apoyo académico

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Ecología Microbiana Medioambiental del Departamento de Biociencias de la Facultad de Química de la Universidad de la República en Uruguay, bajo la dirección de Dra. Ana Fernández Scavino y con la especial ayuda de Ma. Inés Bellini y Johnatan Da Cunha.

## Apoyo financiero

La investigación que da origen a los resultados presentados en la presente publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) bajo el código de beca POS\_NAC\_2012\_1\_8855.

Los fondos para financiar el proyecto se obtuvieron de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (Proyecto CSIC -SP 603) "Selección y caracterización de bacterias para el desarrollo de un proceso tecnológico de biorremediación de la contaminación por atrazina en fuentes de agua para abastecimiento de la población". Colaboración con el Laboratorio Central de OSE en la coordinación y muestreo en las plantas de potabilización. Agradecemos especialmente a la Ing. Quim. Gianella Bonari.

## Agradecimientos

Agradezco a todos los que colaboraron para que pueda realizar este trabajo, especialmente a Ana Fernández por dirigir el trabajo, a los compañeros del laboratorio Ma. Inés Bellini, Johnatan Da Cunha, Andrea Martínez, Gastón Rariz y Lucía Ferrando por el apoyo e intercambio de conocimiento, al tribunal por los aportes y correcciones, a toda la cátedra de Microbiología por el apoyo. También agradezco a mi familia muy especialmente a mi madre y a mi hermana por estar siempre presentes.

## Tabla de contenidos

R	esumen	.7
1.	Introducción	.9
	1.1. Situación agrícola actual y usos de	.9
	1.2. Toxicidad y persistencia de atrazina1	10
	1.3. Microorganismos como potenciales herramientas biotecnológicas para la descontaminación de atrazina1	2
	1.4. Diversidad y distribución geográfica de los microorganismos degradadores de atrazina	
	1	2
	1.5. Metabolismo de atrazina bajo condiciones limitantes de carbono y nitrógeno1	6
	1.6. Vías hidrolíticas de mineralización de atrazina2	22
	1.7. Vías de dealquilación de atrazina2	23
	1.8. Organización y plasticidad de los genes de la vía hidrolítica en el genoma bacteriano2	25
	1.9. Antecedentes de nuestro trabajo previo2	27
2.	Objetivos	28
	2.1. Objetivo general	28
	2.2. Objetivos específicos	28
3.	Materiales y métodos2	29
	3.1. Reactivos químicos	29
	3.2. Medios de cultivo2	29
	3.3. Determinación de atrazina y sus metabolitos por HPLC	30
	3.4. Determinación de nitrato	31
	3.5. Determinación de la biomasa	31
	3.6. Consorcios bacterianos y muestreo	32
	3.7. Extracción del ADN total	33
	3.8. Determinación de la composición de los consorcios por clonado del gen <i>ARNr16S</i> y análisis por ARDRA	33
	3.9. Análisis de la estructura por T-RFLP del gen ARNr16S	34
	3.10. Aislamiento de cepas degradadoras de atrazina y de los intermediarios de biodegradación	34
	3.11. Secuenciado del gen ARNr16S y análisis filogenético	35
	3.12. Detección molecular de los genes de la vía de degradación de atrazina	36
	3.13. Perfil de acumulación de metabolitos	36

3.14. Curvas de crecimiento en atrazina y ácido cianúrico
3.15. Ensayo en microcosmos para seleccionar nuevas bacterias degradadoras de atrazina en distintas temperaturas y fuentes alternativas de nitrógeno
3.16. Enriquecimientos sucesivos en presencia de nitrato y a distintas temperaturas38
4. Resultados
4.1. Estructura y composición de los consorcios SAC1 y SAC2540
4.1.1. Clonado del gen ARNr16S y análisis de ARDRA40
4.1.2. Análisis de los consorcios por T-RFLP del gen ARNr16S41
4.1.3. Aislamiento e identificación de cepas degradadoras de atrazina y sus intermediarios metabólicos44
4.1.4. Análisis filogenético del gen ARNr16S45
4.2. Caracterización metabólica de los consorcios47
4.2.1. Detección molecular de los genes de la vía de degradación de atrazina47
4.2.2. Perfil de acumulación de metabolitos48
4.2.3. Crecimiento a partir de atrazina y ácido cianúrico
4.3. Efecto del nitrato y la temperatura en la degradación de atrazina
4.3.1. Ensayos en microcosmos en diferentes condiciones52
4.3.2. Análisis de los consorcios obtenidos en distintas condiciones
4.3.3. Crecimiento de SAC25 en ácido cianúrico58
<b>5. Discusión</b>
5.1. Composición y diversidad de los consorcios estables60
5.2. Caracterización metabólica64
5.3. Estabilidad bajo distintas condiciones68
6. Conclusiones71
7. Referencias bibliográficas
Anexo I

## Índice de figuras

Figura 1.1. Estructura química de la 1,3,5-triazina y tres de sus derivados: atrazina, terbutilazina y simazina11
Figura 1.2. Vía hidrolítica de mineralización de atrazina24
Figura 1.3. Mapa del plásmido catabólico pADP-1 de Pseudomonas sp. strain ADP26
Figura 3.1. Curvas de calibración de los estándares de atrazina, hidroxiatrazina y ácido cianúrico
Figura 4.1. Distribución de OTUs en los consorcios degradadores de atrazina SAC1 y SAC25 previos a la liofilización obtenidas luego de analizar por ARDRA las bibliotecas del gen <i>ARNr16S</i> 41
Figura 4.2. Curvas de rarefacción de las bibliotecas del gen ARNr16S de SAC1 y SAC2541
<b>Figura 4.3</b> . Estructura de los consorcios SAC1 y SAC25 posteriores a su liofilización, basada en el análisis de T-RFLP del gen <i>ARNr16S</i>
Figura 4.4. Árbol filogenético del gen ARNr16S46
<b>Figura 4.5</b> . Acumulación de metabolitos y biomasa por el consorcio bacteriano SAC25 durante la degradación de atrazina
<b>Figura 4.6</b> . Acumulación de ácido cianúrico por <i>Arthrobacter</i> sp. durante la degradación de atrazina50
<b>Figura 4.7</b> . Curvas de crecimiento en medio MDC con ácido cianúrico (25 mg L <sup>-1</sup> ) como única fuente de nitrógeno
<b>Figura 4.8</b> . Degradación de atrazina en los microcosmos incubados en distintas condiciones con agua de las plantas potabilizadoras de Aguas Corrientes (RAC) y Dolores (RD)
<b>Figura 4.9</b> . Dendrograma obtenido por el método UPGMA de los perfiles de T-RFLP obtenidos con la enzima de restricción <i>Hha</i> I en los enriquecimientos de Dolores y Aguas Corrientes56
<b>Figura 4.10</b> . Estructura de la comunidad bacteriana basada en el análisis de T-RFLP del gen <i>ARNr16S</i> , en los enriquecimientos de SAC25 adaptados a distintas condiciones
<b>Figura 4.11</b> . Dendrograma obtenido por el método UPGMA de los perfiles de T-RFLP ( <i>Msp</i> I) del consorcio SAC25 subcultivado a dos temperaturas y en presencia de nitrato
Figura 5.1. Hipótesis de funcionamiento del consorcio SAC2565

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.1.</b> Propiedades fisicoquímicas de la molécula de atrazina
Tabla 1.2. Cultivos puros involucrados en el catabolismo de la atrazina
Tabla 1.3. Cultivos mixtos involucrados en el catabolismo de la atrazina  20
Tabla 3.1. Condiciones ensayadas en las muestras de agua tomadas de las plantaspotabilizadoras de Dolores, Aguas Corriente y Florida38
Tabla 4.1. Fragmentos de restricción (pb) obtenidos del análisis de T-RFLP del gen ARNr165.41
Tabla 4.2. Identificación de algunas cepas representativos obtenidas de los consorciosdegradadores de atrazina SAC1 Y SAC2542
Tabla 4.3. Detección de los genes de la vía de degradación de atrazina en las cepas obtenidosde los consorcios SAC1 y SAC25 a partir de distintos intermediarios metabólicos47
Tabla 4.4. Porcentaje de degradación de atrazina en los subcultivos sucesivos incubados a 20 oa 30°C en presencia o en ausencia de nitrato54
Tabla 4.5. Detección de los genes de la vía de degradación de atrazina y cuantificación de losmetabolitos en los enriquecimientos obtenidos de las muestras RD y RAC55
Tabla 4.6. Crecimiento en ácido cianúrico de los consorcios bacterianos SAC25 adaptados adistintas condiciones

### Resumen

La creciente intensificación de la agricultura ha expandido el uso de herbicidas que actualmente constituyen más del 70% de los productos fitosanitarios importados en Uruguay. Aunque su uso está restringido en muchos países desarrollados, los herbicidas triazínicos como la atrazina (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5triazina) son ampliamente usados en cultivos de maíz, sorgo y caña de azúcar. Son tóxicos y altamente persistentes en el ambiente, particularmente en los cursos de agua. En los últimos años, se han detectado esporádicamente trazas de atrazina en reservas de agua del sur y oeste de Uruguay, que son fuente para el suministro de agua potable de gran parte de la población. La factibilidad de aplicar un proceso tecnológico de descontaminación usando bacterias, depende de saber cuáles son las especies implicadas y cómo se comportarían en condiciones ambientales variables. En este trabajo se determinó, mediante técnicas moleculares y técnicas tradicionales de cultivo, la composición de consorcios de bacterias degradadoras de atrazina obtenidos a partir de plantas potabilizadoras de agua del Uruguay. Además, se evaluó algunos factores que podrían incidir en la estabilidad de la capacidad degradadora de diferentes consorcios.

Se realizó la caracterización de dos consorcios estables degradadores de atrazina (SAC1 y SAC25) obtenidos previamente. La composición relativa de las especies se determinó mediante el clonado del gen *ARNr16S*. Se analizó alrededor de 40 clones mediante ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) y se eligió un representante de cada perfil de ARDRA para su secuenciación y análisis filogenético. En ambas bibliotecas se observó dominancia de la misma unidad taxonómica que tiene un alto porcentaje de similitud con *Aminobacter cicenorei*. Por otra parte, se aisló bacterias a partir de SAC1 y SAC25 en distintos medios de cultivo que contenían atrazina o intermediarios de la vía de degradación como única fuente de nitrógeno. Se obtuvo 29

cepas en las que se detectó los genes que codifican para las enzimas de la vía de degradación y se determinó el consumo de atrazina y los metabolitos por HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Las cepas se identificaron como: *Arthrobacter ureafaciens, Pseudomonas citronellolis, Ochrobactrum rhizosphaerae, Xanthobacter aminoxidans, Ancylobacter rudongensis* y *Achromobacter xylosoxidans.* Se encontró que *Arthrobacter ureafaciens* y *Pseudomonas citronellolis* fueron las únicas especies que tendrían la capacidad de iniciar la hidrólisis de la atrazina ya que contienen los genes *trzN, atzB* y *atzC.* Por otro lado, el gen *trzD,* que codifica para la enzima que hidroliza el ácido cianúrico, se detectó en todas las especies aisladas excepto en *Arthrobacter ureafaciens,* sugiriendo que la capacidad para degradar el ácido cianúrico está distribuida en una mayor diversidad de especies. Estos resultados también indican que son necesarias al menos dos especies bacterianas de estos consorcios para la mineralización de atrazina.

En la siguiente etapa, se evaluó si la presencia de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como fuente alternativa de nitrógeno y una temperatura menor de incubación, disminuía la capacidad de diferentes consorcios de degradar atrazina. Los resultados mostraron que la capacidad degradadora se mantuvo en presencia de nitrato en enriquecimientos provenientes de diferentes sitios. El consorcio SAC25 fue el más estable ya que, después de más de 10 repiques sucesivos, mantuvo su actividad degradadora en todas las condiciones ensayadas.

# 1. Introducción

#### 1.1. Situación agrícola actual y usos de atrazina

En las últimas décadas, en Uruguay y otros países productores de alimentos, ha habido un cambio sustancial en la actividad agrícola, que consistió en la sustitución del laboreo convencional de la tierra por la siembra directa, en conjunto con la incorporación de nuevas tecnologías. Esta revolución tecnológica en el agro, es muy beneficiosa en términos de las divisas que ingresan a los países, ya que permite expandir la frontera agropecuaria a zonas que anteriormente no se destinaban a ese fin, además de aumentar el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, uno de los problemas que sobresale de este nuevo modo de producción es que requiere de una gran cantidad de agroquímicos. El aumento del uso de plaguicidas y fertilizantes en los cultivos y la falta de buenas prácticas agrícolas han generado un impacto negativo sobre otros servicios que prestan los ecosistemas, muchas veces causando pérdida de biodiversidad y deterioro en la calidad de los suelos y el agua (Cespedes-Payret et al. 2009). En particular, las reservas de agua dulce, que representan sólo el 2.5 % del agua del planeta, son de los ecosistemas más vulnerados por las prácticas agrícolas (Benner et al. 2013).

Del total de plaguicidas usados a nivel mundial, los herbicidas son los que constituyen el mayor porcentaje. Entre ellos, la atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) es uno de los herbicidas más usados en el mundo para controlar una gran variedad de malezas de hoja ancha y pastos anuales (Mudhoo y Garg 2011; Peterson et al. 2001; US-EPA 2011). Se aplica tanto en pre emergencia como en pos emergencia temprana, principalmente en cultivos de maíz, sorgo y caña de azúcar.

[9]

Aunque en menor proporción, también se usa en campos de golf, bordes de carreteras y bosques de coníferas (Sherchan y Bachoon 2011). En EEUU, atrazina alcanzó su máximo uso a principios de los años 90, cuando se llegó a aplicar un promedio de 28 millones de kg por año (Solomon et al. 1996; US-EPA 1997). Su frecuente detección en reservas de agua para consumo humano en concentraciones que exceden los niveles máximos permitidos de 3 µg L<sup>-1</sup> ha ocasionado preocupación en la United States Environmental Protection Agency (Benner et al. 2013; US-EPA 1994). En la Unión Europea sucedió algo similar, hasta el punto que desde 2004 fue prohibida en varios países tales como Austria, Dinamarca, Francia, Alemania, Italia, Suecia y Noruega (Comisión UE 2004; Martin-Laurent et al. 2006).

En Uruguay, los datos del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) indican que es el segundo herbicida importado en mayor cantidad siguiendo al glifosato. En kilogramos de sustancia activa, ingresaron al país un promedio de 460 mil kg de principio activo por año entre el 2010 y el 2014 (MGAP 2015). En los laboratorios de Obras Sanitarias del Estado (OSE) se ha detectado trazas de atrazina en varias reservas de agua del sur y oeste del país, que son fuente para el suministro de agua potable para gran parte de la población (Porto et al. 2011). La presencia de este herbicida se ha detectado esporádicamente, principalmente a fines de primavera y comienzos de verano (El País Digital 2010; La diaria 2014).

#### 1.2. Toxicidad y persistencia de atrazina

Según su naturaleza química, atrazina pertenece a la familia de los herbicidas striazínicos. Todos ellos tienen una estructura en común que consiste en un anillo heterocíclico formado por tres átomos de nitrógeno y tres de carbono. Las cadenas laterales que sustituyen los carbonos del anillo, son las que determinan si el compuesto derivado es atrazina u otro herbicida de la misma familia, como terbutilazina o simazina (Figura 1.1). En la molécula de atrazina los sustituyentes son: un átomo de cloro, una cadena etilamino y una cadena isopropilamino.

El herbicida atrazina es clasificado por los programas de control de malezas como persistente, que proporciona un control residual de malezas durante toda la

[10]

temporada y que presenta una alta movilidad, por lo que es susceptible de ser transportado fuera del área de cultivo (Krutz et al. 2010; Stipicevic et al. 2015). Actúa como inhibidor del fotosistema II de las malezas, bloqueando el transporte de electrones hacia el oxígeno; lo cual conduce a una disminución gradual en la capacidad de fijar dióxido de carbono y la eventual muerte de la maleza (Peterson et al. 2001). Su solubilidad en agua alcanza hasta 32 mg L<sup>-1</sup> a 20°C (Tabla 1.1), por lo que es frecuente encontrarla como contaminante en reservas de agua superficial y subterráneas (Solomon et al. 1996).



**Figura 1.1.** Estructura química de la 1,3,5-triazina y tres de sus derivados: atrazina, terbutilazina y simazina.  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  indica los sitios donde se adiciona los sustituyentes.

Grupo	Triazinas
Fórmula química	$C_8H_{14}CIN_5$
Punto de ebullición	205 °C
Punto de fusión	175-176 °C
Densidad relativa	1.23 g/cm <sup>3</sup> (a 22 °C)
Solubilidad en agua	32 mg L <sup>-1</sup> (a 20 °C)
Solubilidad en metanol	15 g L <sup>-1</sup> (a 25 °C)
Presión de vapor	0.04 mPa (a 20 °C)
Constante de Henry	2.96.10 <sup>-9</sup> atm m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> (a 25°C)

Tabla 1.1. Propiedades fisicoquímicas de la molécula de atrazina

La vida media de los herbicidas depende en gran medida del control que ejerzan los procesos de retención, transporte y sobre todo degradación. A su vez, estos dependen del tipo de suelo, materia orgánica, pH, temperatura, humedad, oxígeno y actividad

microbiana (Schwab et al. 2005). Para atrazina los principales factores que influyen son la degradación, el pH y la historia previa de aplicación de atrazina en un ambiente determinado (Krutz et al. 2010). En aguas superficiales, es probable que la presencia de atrazina y sus metabolitos sea intermitente, con una vida media estimada que varía entre 20 y 100 días. Sin embargo, en aguas subterráneas, donde las tasas metabólicas son menores, puede persistir por años (Abate y Masini 2005; Mandelbaum et al. 1993; Mudhoo y Garg 2011; Schwab et al. 2005). En suelos que han tenido antecedentes de aplicación del herbicida, se ha determinado la vida media en condiciones de laboratorio, con valores que rondan entre los 9 y los 20 días (Fang et al. 2015). Su presión de vapor y constante de Henry son bajas, por lo que posee un bajo potencial de contaminar por vía aérea (Solomon et al. 1996).

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO), atrazina entra en la Categoría III de toxicidad, calificada como compuesto ligeramente peligroso (WHO 2009). Sin embargo, algunos autores han encontrado que produce roturas cromosómicas en células de ovarios de ratones cuando son expuestos aun a concentraciones aceptables por la US-EPA (Biradar y Rayburn 1995). Otros experimentos realizados en renacuajos (*Xenophus laevis*) expuestos a concentraciones bajas de atrazina (21 µg L<sup>-1</sup>) durante la diferenciación celular de los ovarios, mostraron una reducción en la cantidad de células germinales (Tavera-Mendoza et al. 2002). Se ha visto que atrazina es un disruptor endocrino en ranas produciendo hermafroditismo y demasculinización de los machos (Hayes et al. 2002). Asimismo, los metabolitos de atrazina (2-cloro-4-amino-6-isopropilamina-1,3,5-triazina) y deisopropilatrazina (2-cloro-4-etilamino-6-amino-1,3,5-triazina), también están regulados y pueden causar riesgos a la salud (Kolpin et al. 1998).

## 1.3. Microorganismos como potenciales herramientas biotecnológicas para la descontaminación de atrazina.

La degradación microbiana es una de las principales vías por las que se remueve la mayoría de los contaminantes del ambiente. Las técnicas de biorremediación fueron aplicadas por primera vez por la industria petrolera, usando intencionalmente los

[12]

procesos de biodegradación, para eliminar o atenuar la contaminación de petróleo en distintos ambientes. Tanto las técnicas de biorremediación *in situ* como *ex situ*, se convirtieron en una buena alternativa a los métodos de remediación físicos o químicos, por su bajo costo y bajo impacto en el ambiente (Madsen 2008; Newcombe y Crowley 1999).

Existen varias formas de usar microorganismos en los procesos de descontaminación. En general las técnicas más eficientes son las que usan la microbiota natural proveniente del mismo ambiente o de uno similar. Se supone que los microorganismos autóctonos están adaptados a sobrevivir frente permanentes cambios ambientales, y muchas veces, son capaces de degradar más de un contaminante a la vez (Atlas 2001). También se puede usar microorganismos genéticamente modificados diseñados específicamente para degradar un herbicida. Sin embargo, pueden tener dificultades para ser efectivos *in situ* debido a que deben competir con otros microorganismos autóctonos mejor adaptados; además, se debe asumir los riesgos asociados a la liberación de microorganismos genéticamente modificados al ambiente (Atlas 2001).

En general, en las plantas potabilizadoras de agua, cuando se detecta trazas de atrazina en el agua que ingresa, se aplica un adsorbente como el carbón activado para removerla. Este mecanismo no elimina definitivamente el herbicida del ambiente y adiciona un elevado costo al proceso de purificación. A diferencia de los procesos fisicoquímicos, la actividad microbiana es la única vía a través de la que se puede transformar totalmente la molécula de atrazina hasta CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>, proceso que se denomina mineralización. Si bien por fotólisis (Baranda et al. 2011) o por hidrólisis química (Laird y Koskinen 2008) pueden hidrolizarse algunos sustituyentes del anillo de atrazina, el principal mecanismo de degradación a pH neutro es el de origen microbiano (Krutz et al. 2010). La hidrólisis química es relativamente rápida a pH muy ácido o muy básico, pero es lenta en suelos neutros (Krutz et al. 2010; Laird y Koskinen 2008).

En varios países se han patentado procesos de degradación microbiana de atrazina con cultivos puros y mixtos de microorganismos (Mandelbaum y Wackett 1996; Niu et al. 2013). El cultivo puro bacteriano designado como M91-3 patentado en USA, es capaz de mineralizar atrazina como única fuente de carbono y nitrógeno (Radosevich et al.

[13]

1995a). El cultivo mixto de bacterias Atz Mix 1, patentado en USA, es capaz de degradar atrazina y otros compuestos s-triazínicos en suelos ricos en nitrógeno, en un rango amplio de concentraciones que van desde algunos µg L<sup>-1</sup> hasta miles de mg L<sup>-1</sup> y en varias temperaturas distintas (entre 10 y 30°C) (Hrsak y Havriluk 2010). Se ha demostrado que generalmente los cultivos mixtos de microorganismos son más adecuados para usar en biorremediación en comparación con los cultivos puros. Probablemente esto se deba a que cuanto mayor sea la diversidad de microorganismos, mayor es la probabilidad de que alguno de ellos sobreviva frente a posibles variaciones ambientales y por lo tanto es más probable que perdure la función (Siripattanakul et al. 2009).

### 1.4. Diversidad y distribución geográfica de los microorganismos degradadores de atrazina.

Previo a la introducción al ambiente de los herbicidas s-triazínicos en 1950, ya había algunos compuestos naturales y artificiales que se asemejaban en su estructura química. Un ejemplo son las piridinas, que forman parte de una extensa gama de compuestos de los seres vivos, como los ácidos nucleicos y ribonucleicos, NAD, nicotina y vitamina B3. La melamina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazina) es un compuesto artificial, introducido al ambiente antes que las s-triazinas y que se parece aun más en su estructura química (Madsen 2008). Desde su aparición, los herbicidas s-triazínicos han sido una fuente más de nutrientes disponible para los microorganismos (Modhoo y Garg 2011). Una gran variedad de bacterias evolucionaron para degradarlos, ya sea en forma parcial o bien mineralizándolos. A la fecha se han aislado un gran número de bacterias implicadas en la vía de degradación de atrazina, sin embargo hay un número muy reducido de casos en los que un único microorganismo sea capaz de mineralizar completamente la molécula (Tabla 1.2). Hay varios reportes donde participan cultivos mixtos o consorcios bacterianos formados entre dos y ocho miembros, que en conjunto se complementan para completar la vía de degradación (Tabla 1.3). Se presume que estas asociaciones están formadas por bacterias de distintos géneros, que se encuentran espacialmente muy próximas entre sí y que se relacionan a través

de la transferencia de genes y la alimentación cruzada de metabolitos (de Souza et al. 1998a).

Los primeros aislamientos de bacterias capaces de mineralizar atrazina se obtuvieron a comienzos de la década del 90. Entre ellos están las cepas *Pseudomonas* sp. YAYA6, *Pseudomonas* sp. ADP y *Ralstonia* sp. M91-3 (Mandelbaum et al. 1995; Radosevich et al. 1995b; Yanze y Gschwind 1994). La cepa *Pseudomonas* sp. ADP, ha sido extensamente estudiada y ha permitido establecer las bases moleculares del mecanismo de mineralización de atrazina (Shapir et al. 2007; Martínez et al. 2001). Es un bastón, móvil, Gram negativo, que contiene todos los genes de la vía y es capaz de mineralizar altas concentraciones de atrazina (1000 mg L<sup>-1</sup>) cuando es la única fuente de nitrógeno presente en el medio. Presenta la característica de desarrollar una zona clara alrededor de las colonias cuando crece en este medio sólido opaco debido a que contiene atrazina en cantidades que superan ampliamente su solubilidad (Mandelbaum et al. 1995).

Las bacterias capaces de degradar atrazina son filogenéticamente muy diversas. Se encontró bacterias Gram positivas de los órdenes Actinomicetales y Bacillales que incluyen los géneros Arthrobacter, Nocardioides, Clavibacter, Mycobacterium, Rhodococcus y Bacillus. También hay bacterias Gram negativas, pertenecientes a los órdenes Rhizobiales, Burkholderiales, Pseudomonodales, Enterobacteriales, Xanthomonadales y Sphingomonadales, Spirochaetales que comprenden una gran diversidad de géneros como Pseudomonas, Pseudoaminobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Ancylobacter, Achromobacter, Ralstonia, Rizhobium, Shpingomonas, Burkholderia, Klebsiella, Ochrobactrum, Stenotrophomonas, Flavobacterium y Leptospira (Tabla 1.2 y 1.3). También existen reportes de varios hongos, obtenidos de suelos, capaces de degradar atrazina (Kaufman y Blake 1970; Masaphy et al. 1993; Nwachukwu y Osuji 2007). Sin embargo, la degradación por hongos, generalmente es parcial, a través de las vías de dealquilación de las cadenas laterales de la molécula, dando como producto metabolitos intermediaros clorados que, en muchos casos, son tóxicos (Masaphy et al. 1993).

La degradación microbiana se ha visto en todos los continentes excepto en la Antártida, por lo que puede decirse que la función está ampliamente distribución en el

[15]

planeta (Aislabie et al. 2005; Arbeli y Fuentes 2010; Hernández et al. 2008; Satsuma et al. 2006; Topp et al. 2000; Vaishampayan et al. 2007). La mayoría de los microorganismos que se estudiaron provienen de muestras tomadas en suelos agrícolas donde se aplicó atrazina durante varios años o en sitios muy contaminados como los efluentes de fábricas de atrazina (Tablas 1.2 y 1.3). Sin embargo, hay pocos trabajos donde se haya intentado aislar bacterias degradadoras de atrazina de sitios donde la historia de exposición fue corta o esporádica, como por ejemplo en reservas de agua superficial y subterránea o en humedales (Anderson et al. 2002; Bellini et al. 2014; Feaking et al. 1994; Satsuma et al. 2006).

### Metabolismo de atrazina bajo condiciones limitantes de carbono y nitrógeno.

Dependiendo de las condiciones nutricionales del ambiente, la molécula atrazina puede ser usada por los microorganismos como fuente de carbono o nitrógeno para su crecimiento. La oxidación de las cadenas laterales son las únicas que eventualmente podrían proveer de energía a los microorganismos, ya que los carbonos del anillo se encuentran completamente oxidados y por lo tanto no son capaces de donar electrones. Esto la convierte en una fuente pobre de energía. Existen reportes de bacterias que tienen la posibilidad de utilizar los carbonos de la atrazina cuando es la única fuente de carbono disponible en el medio (Fazlurrahman et al. 2009; Radosevich et al. 1995b; Smith et al. 2005; Yang et al. 2010). La cantidad de átomos de N, es alta en comparación con la composición celular bacteriana. En total, una molécula de atrazina puede aportar hasta cinco átomos de N (dos de las cadenas laterales y tres del anillo). Esto la convierte en una buena fuente de nitrógeno, sobre todo bajo condiciones ambientales donde sea el elemento limitante (Bichart et al. 1999; Radosevich et al. 1995b; Rhine et al. 2003). La mayoría de los trabajos que se han dedicado a aislar bacterias o consorcios degradadores de atrazina utilizan medios de cultivo minerales mínimos a los que se le agrega alguna fuente de carbono y energía como citrato, glucosa, glicerol, acetato, succinato, etc y atrazina como única fuente de nitrógeno (Satsuma 2010; Vibber y Pressler 2007; Yang et al. 2010).

Сера	Orden	Origen	Historia de contaminación	Genes	Ubicación de los genes	Producto final de degradación	Fuente de carbono	Referencia
Burkholderia cepacia ISL-8	- Burkholderiales	Suelo caña de azúcar, Kenia	Larga	Nd	Nd	Hidroliza atrazina	Glucosa	Nigigi et al. 2012
Polaromonas sp. NEA-C	- Burkholderiales	Suelo agrícola, Francia	Media	trzN-atzBC	Cromosoma ( <i>trzN-atzBC</i> )	Ácido cianúrico	Citrato	Devers et al. 2007a
Ralstonia sp. M91-3	- Burkholderiales	Suelo agrícola	Larga	Nd	Nd	$NH_4^+ + CO_2$	Atrazina, glucosa	Radosevich et al. 1995b
Enterobacter cloacae ISL-14	- Enterobacteriales	Suelo caña de azúcar, Kenia	Larga	Nd	Nd	Hidroliza atrazina	Glucosa	Nigigi et al., 2012
Raoultella planticola	- Enterobacteriales	Lodos residuales fabrica de herbicidas, Israel	Larga	Nd	Nd	Hidroliza atrazina	Citrato	Swissa et al., 2014
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	- Pseudomonadales	suelo contaminado, USA	Larga	atzABCDE, IS1071	Plásmido 110 kb (todos)	$NH_4^+ + CO_2$	Glucosa, citrato	de Souza et al. 1998a; Mandelbaum et al. 1995
Pseudomonas sp. EGD-AKN5	- Pseudomonadales	Suelo cultivo caña de azúcar, India	Larga	atzABCDEF		Hidroliza bi-urea	Fenol,	Bhardwaj et al. 2015
Agrobacterium sp. NEA-D	- Rhizobiales	Suelo agrícola, Francia	Larga	atzABCDE; IS1071	Plásmido 137 kb (todos)	$NH_4^+ + CO_2$	Citrato	Devers et al. 2007a
Agrobacterium radiobacter J14a	- Rhizobiales	Suelo agrícola, USA	Larga	Nd	Nd	$NH_4^+ + CO_2$	Glucosa y citrato	Struthers et al. 1998
<i>Aminobacter aminovorans</i> Ep2-1c	- Rhizobiales	Suelo, Francia	Larga	atzC-trzD	No tiene plásmido	Hidroliza ácido cianúrico	Citrato	Rousseaux et al. 2001; Rousseaux et al. 2002
Ancylobacter sp.T10AII	- Rhizobiales	Suelo , Colombia	Nd	atzABCDEF	Nd	$NH_4^+ + CO_2$	Citrato	Arbeli y Fuentes 2010
Chelatobacter heintzii Sal1-3	- Rhizobiales	Suelo, Francia	Larga	atzABC-trzD; IS1071	Plásmidos 73 kb (atzAC, IS1071); 130 kb (atzBC, trzD, IS1071)	$NH_4^+ + CO_2$	Citrato	Rousseaux et al. 2001; Devers et al. 2007a
Chelatobacter heintzii Sal2	- Rhizobiales	Suelo, Francia	Larga	atzA	Plásmido 77 kb ( <i>atzA</i> )	Hidroxiatrazina	Citrato	Rousseaux et al. 2001; Devers et al. 2007a

#### Tabla 1.2 Cultivos puros involucrados en el catabolismo de la atrazina.

Сера	Orden	Origen	Historia de contaminación	Genes	Ubicación de los genes	Producto final de degradación	Fuente de carbono	Referencia
Chelatobacter heintzii Cit1	- Rhizobiales	Suelo, Francia	Larga	atzABC-trzD; IS1071	Plásmidos 77 kb ( <i>atzA</i> ); 325 kb ( <i>atzBC, trzD,</i> IS <i>1071</i> )	$NH_4^+ + CO_2$	Citrato	Rousseaux et al. 2001; Devers et al. 2007a
Chelatobacter heintzii LR3-3	- Rhizobiales	Suelo, Francia	Larga	atzABC-trzD; IS1071	Plásmidos 77 kb (atzA); 137 kb (atzC, IS1071); 199 kb (atzBC, trzD, IS1071)	$NH_4^+ + CO_2$	Citrato	Rousseaux et al. 2001; Devers et al. 2007a
Chelatobacter heintzii LRA	- Rhizobiales	Suelo, Francia	Larga	atzABC-trzD; IS1071	Plásmidos 77 kb (atzA); 130 kb (atzC, IS1071); 186 kb (atzBC, trzD, IS1071)	$NH_4^+ + CO_2$	Citrato	Rousseaux et al. 2001; Devers et al. 2007a
Chelatobacter heintzii SalB	- Rhizobiales	Suelo, Francia	Larga	atzABC-trzD; IS1071	Plásmidos 77 kb ( <i>atzA</i> ); 199 kb ( <i>atzBC, trzD,</i> IS <i>1071</i> )	$NH_4^+ + CO_2$	Citrato	Rousseaux et al. 2001; Devers et al. 2007a
<i>Chelatobacter heintzii</i> Lous2-3	- Rhizobiales	Suelo, Francia	Larga	atzA	Plásmido 77 kb ( <i>atzA</i> )	Hidroxiatrazina	Citrato	Rousseaux et al. 2001; Devers et al. 2007a
Aminobacter cicenorei C147	- Rhizobiales	Suelo cultivo maíz, Canadá	Larga	atzABC; IS1071	Dos plásmidos > 96 kb ( <i>atzA, atzBC</i> )	$NH_4^+ + CO_2$	Atrazina	McDonald et al. 2005; Topp et al. 2000
Sinorhizobium sp. NEA-B	- Rhizobiales	Suelo agrícola, Francia	Larga	trzN-atzBC	Cromosoma (trzN-atzBC)	Ácido cianúrico	Citrato	Devers et al. 2007a
Arthrobacter nicotinovorans HIM	+ Actinomicetales	Suelo agrícola, Nueva Zelanda	Media	atzABC	Plásmido 96 kb ( <i>atzABC</i> )	Ácido cianúrico	Citrato	Aislabie et al. 2005
Arthrobacter sp. 2B	+ Actinomicetales	Suelo fábrica atrazina, Croacia	Larga	trzN	No se encontró plásmidos	Hidroxiatrazina	Citrato	Devers et al. 2007a
Arthrobacter sp. 3A	+ Actinomicetales	Suelo fábrica atrazina, Croacia	Larga	trzN	No se encontró plásmidos	Hidroxiatrazina	Citrato	Devers et al. 2007a
Arthrobacter sp. AD1	+ Actinomicetales	Efluente fábrica de atrazina, China	Larga	atzA	No se encontró en plásmidos	Nd	Glucosa y citrato	Cai et al. 2003

#### Tabla 1.2 Cultivos puros involucrados en el catabolismo de la atrazina (Cont.)

Сера	Orden	Origen	Historia de contaminación	Genes Ubicación de los gene		Producto final de degradación	Fuente de carbono	Referencia
Arthrobacter crytallopoyetes Cit2	+ Actinomicetales	Suelo agrícola, Francia	Larga	trzN-atzBC; IS1071	Plásmido 200 kb ( <i>trzN-</i> <i>atzBC</i> ; IS1071)	Ácido cianúrico	Citrato	Devers et al. 2007a; Rousseaux et al. 2001
Arthrobacter sp. TES6	+ Actinomicetales	Suelo agrícola, Nilo (Egipto)	Larga	trzN-atzBC	Plásmido 157 kb ( <i>trzN-</i> <i>atzBC</i> )	intermediario	Citrato	El Sebai et a. 2011
Arthrobacter crystallopoietes	+ Actinomicetales	Suelo, Francia	Larga	<i>atzBC</i> (no se analizó <i>trzN</i> )	Plásmido 380 kb ( <i>atzBC</i> )	Ac. cianúrico	Citrato	Rousseaux et al. 2001; Rousseaux et al. 2002
Arthrobacter aurescens TC1	+ Actinomicetales	Derrame en suelo	Larga	trzN-atzBC; IS1071	Plásmido 160 kb ( <i>trzN-</i> <i>atzBC</i> )	Ac. Cianúrico	atrazina, s- triazinas	Sajjaphan et al. 2004; Strong et al. 2002
Arthrobacter sp. MCM B- 436	+ Actinomicetales	Suelo rizosférico, India	Media	trzN-atzBCD	Cromosoma	Bi-urea	Medio LB	Vaishampayan et al. 2007
Arthrobacter sp. DAT1	+ Actinomicetales	Suelo agrícola, China	Larga	trzN-atzBC	Plásmido	Ac. cianúrico	Glucosa	Wang y Zie 2012
Arthrobacter sp. DNS10	+ Actinomicetales	suelo agrícola, China	Nd	trzN-atzBC	Nd	Ac. cianúrico	Glucosa	Zhang et al. 2011
Nocardiodes sp. NEA-A	+ Actinomicetales	Suelo agrícola, Francia	Larga	trzN-atzBC	Cromosoma ( <i>trzN-atzBC</i> )	Ácido cianúrico	Citrato	Devers et al. 2007a
Nocardiodes sp. SP12	+ Actinomicetales	Suelo agrícola, Francia	Larga	trzN-atzBC; IS1071	Plásmido 200 kb ( <i>trzN-</i> <i>atzBC</i> , IS <i>1071</i> )	Ácido cianúrico	Citrato	Devers et al. 2007a, Piutti et al. 2003
Nocardiodes sp. 1D	+ Actinomicetales	Suelo fábrica atrazina, Croacia	Larga	trzN	No tiene plásmidos	Hidroxiatrazina	Citrato	Devers et al. 2007a
Nocardioides sp. DN36	+ Actinomicetales	Suelo de arroz, Japón	Nd	trzN-atzBC	Nd	$NH_4^+ + CO_2$	R2A diluido	Satsuma 2010
Rhodococcus sp.MB-P1	+ Actinomicetales	Suelo contaminado, India	Larga	Vía N dealquilación	Plasmido	De-etil-de- isopropil- hidroxiatrazina	Atrazina	Fazlurrahman et al. 2009
Bacillus subtilis HB-6	+ Bacillales	Agua residual de fábrica, China	Larga	trzN-atzBC	Nd	Hidroliza ácido cianúrico	Glucosa	Wang et al. 2014

#### Tabla 1.2 Cultivos puros involucrados en el catabolismo de la atrazina (Cont.)

#### Tabla 1.3 Cultivos mixtos involucrados en el catabolismo de la atrazina.

Consorcio	Origen	Historia de contaminación	Composición génica	Ubicación de los genes	Producto final de degradación	Fuente de carbono	Referencia
Alcaligenes + Pseudomonas + Providenza	Suelo contaminado, USA	Larga	Nd	Nd	Hidroliza atrazina	Atrazina, alachlor	Chirnside et al. 2007
Clavibacter michiganese ATZ1 + Pseudomonas sp. CN1	Suelo agrícola, USA	Larga	atzABC	Nd	$NH_4^+ + CO_2$	Glucosa, atrazina	De Souza et al. 1998a
Stenotrophomonas maltophilia + Arthrobacter sp.	Nd	Nd	atzABCD	Nd	$NH_4^+ + CO_2$	-	Galíndez-Nájera et al. 2011
M3: Arthrobacter sp. ATZ1 + Arthrobacter sp. ATZ2 + Ochrobactrum sp. CA1+ Pseudomonas sp. CA1	Suelo contaminado, Croacia	Larga	trzN-atzBC-trzD	Nd	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + CO <sub>2</sub>	Citrato	Kolic et al. 2007
V1: Pseudomonas sp (dominante según clonado) + Flavobacterium sp. + Achromobacter sp. + Agrobacterium sp + Spirosomonas sp. + otros	Efluente de fábrica de atrazina, Croacia	Larga	trzN-atzBC-trzD	Plásmido 322 kb ( <i>trzN-atzBC</i> )	NH4 <sup>+</sup> + CO <sub>2</sub>	Citato, extracto de levadura	Kolic et al. 2008
Comunidad no determinada	Suelo agrícola contaminado, Minnesota USA	Alta	Nd	Nd	$NH_4^+ + CO_2$	Glucosa, citrato	Mandelbaum et al. 1993
MSA15: Variovorax paradoxus +Burkholderia cepacia + Arthrobacter sp. + Bosea sp.+ Rizhobium sp. +Mycobacterium mucogenicum + Agrobacterium tumefaciens + otras	Rizósfera y suelo de cultivo maíz, Francia	Alta	trzN-atzABCDEF-trzD	Nd	$NH_4^+ + CO_2$	Citrato	Martin-Laurent et al. 2006
A14N: Nocardioides sp. A14N + Mycobacterium sp. A14 + Leptospira sp. A14	Sedimento y agua de río, Japón	Baja	trzN-atzBC	Nd	$NH_4^+ + CO_2$	Caldo nutritivo diluido	Satsuma 2006

Consorcio	Origen	Historia de contaminación	Composición génica	Ubicación de los genes	Producto final de degradación	Fuente de carbono	Referencia
AN4: Nocardioides sp. AN4-4 + Pedomicrobium sp. AN4-9 + otros	Sedimento y agua de río, Japón	Baja	trzN-atzC	Nd	$NH_4^+ + CO_2$	R2A, caldo nutritivo	Satsuma 2009
Alcaligenes faecalis ND1 + Klebsiella ornithinolytica ND2+ Bacillus megaterium ND3 + Agrobacterium tumefaciens ND4	suelo contaminado, Oakes USA	Alta	atzA	Nd	Nd	Glucosa	Siripattanakul et al. 2009
Agrobacterium tumefaciens + Caulobacter crescentus + Pseudomonas putida + Sphingomonas yaniokuyae + Nocardia sp.+ Rhizobium sp.+ Flavobacterium oryzihabitans + Variovorax paradoxus	Suelo agrícola, USA	Alta	trzN-atzBC-trzD	Nd	NH4 <sup>+</sup> + CO <sub>2</sub>	Glucosa, glicerol	Smith et al. 2005
Klebsiella sp. A1 + Comamonas sp. A2	Aguas residuales de fábrica de pesticidas, China	Nd	atzABCDEF	Nd	$NH_4^+ + CO_2$	Atrazina	Yang et al. 2010
DNC5 (Arthrobacter sp. DNS9 + Arthrobacter sp. DNS10 + Bacillus subtilis DNS4 +Variovorax sp. DNS12)	Suelo de cultivo de maíz, China	Tratado con atrazina	Nd	Nd	Hidroliza ácido cianúrico	Glucosa	Zhang et al. 2012

#### 1.6. Vías hidrolíticas de mineralización de atrazina

En la mayoría de los microorganismos reportados desde 1990 a la fecha, el metabolismo de la atrazina transcurre a través de la hidrolisis de la molécula hasta su mineralización. En esta vía actúan secuencialmente seis hidrolasas, encargadas de catalizar: la declorinación, dos dealquilaciones, la hidrólisis del anillo, la deaminación de la carbamoilurea y la hidrólisis del alofanato.

El primer paso consiste en la sustitución del átomo de cloro unido a uno de los carbonos del anillo triazínico dando como producto hidroxiatrazina (Figura 1.2). Esta etapa está catalizado por las enzimas atrazina-clorohidrolasa codificada por el gen *atzA* o triazina-hidrolasa codificada por el gen *trzN* (Shapir et al. 2006a). Si bien cumplen un rol fisiológico similar, AtzA y TrzN comparten sólo el 27% de similitud en la secuencia de aminoácidos por lo que se cree que la función evolucionó en forma independiente (Kolic et al. 2012).

Los siguientes dos pasos de la vía consisten en la hidrólisis de los sustituyentes etilamino e isopropilamino de la molécula de hidroxiatrazina, por la acción de dos amidohidrolasas. La eliminación puede darse siguiendo dos caminos posibles, primero eliminando el grupo etilamino para dar el intermediario N-isopropilamida, en este caso actúan las enzimas hidroxiatrazina-N-etilaminohidrolasa (AtzB) y luego la N-isopropilamida-hidrolasa (AtzC) (Seffernick et al. 2007; Sadowsky et al 1998). El segundo camino comienza con la eliminación del grupo isopropilamino para dar N-etilamida catalizado por una enzima que aun no está identificada, mientras que la subsiguiente eliminación del grupo etilamino la lleva a cabo la enzima AtzB (de Souza et al. 1998a; Smith et al. 2005). Estos tres primeros pasos forman parte del denominado *upper pathway* que termina en el ácido cianúrico, un intermediario metabólico común de la degradación de varias s-triazinas y de otros compuestos de origen antropogénico como la melanina (Cook et al. 1987; Karns y Eaton 1997; Satsuma 2010).

Los siguientes tres pasos son esenciales para completar la mineralización hasta NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O y forman parte del llamado *lower pathway*. La ruptura del ácido cianúrico lo pueden llevar a cabo dos tipos de enzimas, las ácido cianúrico-amidohidrolasas (AtzD y TrzD) dando como producto carbamoilurea (Fruchey et al. 2003; Karns 1999). Ambas enzimas comparten sólo el 56% de su secuencia de aminoácidos y en cualquiera de los dos casos tienen una especificidad de sustrato muy alta (Kolic et al. 2012). A su vez, la carbamoilurea es hidrolizada a urea-1-carboxilato por las hidrolasas AtzE o la recientemente conocida TrzE (Cameron et al. 2011; Cheng et al. 2005). Por último la urea-1-carboxilato es hidrolizada por AtzF o TrzF para dar NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Martinez et al. 2001; Shapir et al. 2006b).

#### 1.7. Vías de dealquilación de atrazina

Existen otras vías de degradación de atrazina. En un comienzo, los metabolitos que se encontraban en el ambiente como productos de degradación eran DEA (2-cloro-4amino-6-isopropilamino-s-triazina), DIA (2-chloro-4-etilamino-6-amino-s-triazin); y DEIA (2-cloro-4,6-amino-s-triazina). Estos compuestos eran generados durante la degradación incompleta de atrazina, por la acción de un grupo de enzimas monooxigenasas que catalizaban la dealquilación oxidativa de las cadenas alquilo laterales de la molécula, sustituyéndolas por aminos. Las monooxigenasas que actúan en los primeros pasos de esta vía cuentan con el sistema citocromo P450 y se caracterizan por tener una baja especificidad de sustrato y actuar sobre una gran variedad de compuestos (Nagy et al. 1995). Existen reportes en hongos de la división Basidiomycota como los hongos blancos de la pudrición de la madera, Phanerochaete chrysosporium (Mougin et al. 1994) y Pleurotus pulmonarius (Masaphy et al. 1993) que son capaces de usar la vía de dealquilación de atrazina generando alguno de los intermediarios mencionados anteriormente. También existen bacterias Gram negativas como Pseudomonas sp. y Gram positivas del orden Actinomycetales como Nocardia sp. (Giardi et al. 1985) y Rhodococcus spp. capaces de usar esta vía. En 1986, fue reportada una cepa de Pseudomonas sp. que era capaz de crecer en atrazina en un período de 30 días usando la vía de oxidación de las cadenas alquilo laterales (Behiki et al. 1986). La vía puede terminar en ácido cianúrico si actúan distintas hidrolasas sobre los compuestos DEA, DIA y DEIA que eliminen el átomo de cloro y los grupos amino del anillo.

[23]



Figura 1.2. Vías hidrolíticas de mineralización de atrazina. Modificado de Kolic et al. 2012.

# 1.8. Organización y plasticidad de los genes de la vía hidrolítica en el genoma bacteriano.

Como se mencionó anteriormente, existen dos familias de genes implicadas en la vía hidrolítica de mineralización de la atrazina, los *atz* y los *trz*. Los genes *atzABCDEF* se reportaron con anterioridad a los *trz*, en aislamientos de bacterias Gram negativas capaces de degradar atrazina. Posteriormente, se encontró que los aislamientos de bacterias Gram positivas capaces de degradar atrazina eran portadores de los genes *trzNDEF* que codifican para enzimas análogas (Strong et al. 2002). No se encontró análogos a los genes *atzBC* en la familia de los *trz*, por lo que, en este caso es necesario que haya combinación de genes de ambas familias para completar la vía metabólica. El gen *trzN* estuvo restringido a las bacterias Gram positivas hasta el año 2007 donde se reportó por primera vez en *Sinorhizobium* sp. NEA-B y *Polaromonas* sp. NEA-C (Devers et al. 2007a), mientras que el gen *atzA* fue encontrado mayoritariamente en bacterias Gram negativas pertenecientes a las *Alfa*, *Beta* y *Gamaproteobacterias* (Tabla 1.2).

Tanto los genes *atz* como *trz* están altamente conservados en diversos géneros de bacterias aun cuando provienen de puntos muy distantes del planeta. Comparten entre un 99-100 % de similitud en su secuencia nucleotídica (de Souza et al. 1998b; Satsuma 2010; Vibber y Pressler 2007; Zhang et al. 2011). Esta gran similitud en la secuencia sostiene la hipótesis de que cada gen surgió en forma reciente de un único origen y se mantuvo sin mayores cambios distribuyéndose globalmente (de Souza et al. 1998b).

Se ha visto que los genes catabólicos de la vía de atrazina, pueden estar localizados en un único plásmido de distinto tamaño según el huésped, en más de un plásmido de distintos tamaños u ocasionalmente en el ADN cromosomal (Tabla 1.2 y 1.3). Martínez et al. (2001) secuenciaron completamente el plásmido pADP-1 de *Pseudomonas* sp. ADP que contiene todos los genes catabólicos de la vía (Figura 1.3). Como se puede ver, existen diferencias en la organización y la regulación de los genes que codifican para las enzimas que participan en el *upper pathway* y el *lower pathway*. Los genes *atzABC* se encuentran dispersos en el plásmido careciendo de una estructura en forma de operón. Se ha verificado que la expresión de estos genes ocurre en forma

[25]

constitutiva (Martínez et al. 2001) sin requerir de inducción por sustrato (Behki et al. 1993). Además, se pudo observar que los genes *atzABC* están rodeados por secuencias IS1071 (Martínez et al. 2001). Por el contrario, los genes *atzDEF* están contiguos, formando un cluster en una estructura tipo operón, que se expresa como un único ARNm (Martínez et al. 2001). La expresión de estos genes en *Pseudomonas* sp. ADP está regulada por la presencia de ácido cianúrico y por un entorno limitado en nitrógeno (García-González et al. 2003).

La adaptación de los microorganismos a la degradación de pesticidas depende en gran medida de la capacidad que tengan de incorporar nuevos genes catabólicos (Changey et al. 2011; Devers et al. 2007b; Shapir et al. 2007). Las secuencias de inserción IS*1071* le confieren plasticidad génica a los microorganismos, mediando la inserción o deleción de elementos génicos. No sólo ayudan a dispersar los genes de la vía entre los individuos de un consorcio sino que también permiten la duplicación en tándem de los genes (Devers et al. 2008) o incluso la deleción de algunos de ellos (Changey et al. 2011). Los virus también cumplen un rol importante como agentes de transferencia horizontal de información. Hay evidencias de que bacteriófagos presentes en muestras de suelos con prolongada historia de exposición a atrazina contienen genes trzN que se liberan al medio cuando se induce la vía lítica (Ghosh et al. 2007).



**Figura 1.3.** Mapa del plásmido catabólico pADP-1 de *Pseudomonas* sp. strain ADP. Se indica las posiciones de los sitios de restricción, genes y operones. Tomado de Martínez et al. 2001.

#### 1.9. Antecedentes de nuestro trabajo previo

Hasta el momento, la mayoría de los microorganismos degradadores de atrazina reportados, se obtuvieron a partir de suelos o sedimentos expuestos por largos períodos de tiempo a altas concentraciones de atrazina. Esto implica que la microbiota estuvo expuesta a una fuerte presión de selección por el herbicida en el ambiente de donde se extrajo la muestra. En nuestro país no se fabrica atrazina, sólo se fracciona a partir del material importado en estado sólido. Para obtener consorcios degradadores nativos, ha sido necesario enriquecer progresivamente bacterias degradadoras a partir de muestras naturales, que tienen escasa probabilidad de haber sido expuestas al herbicida. De esta forma, hemos obtenido dos consorcios degradadores de atrazina a partir de lodos de decantación de la planta potabilizadora de Aguas Corrientes (Bellini et al. 2014). Estos consorcios difirieron en la concentración de atrazina utilizada para seleccionarlos SAC1 (1 mg L<sup>-1</sup>) y SAC 25 (25 mg L<sup>-1</sup>).

La fuente de microorganismos obtenida es valiosa por tratarse de recursos autóctonos, a pesar de que las asociaciones de bacterias podrían ser menos estables ya que no han experimentado la presión de selección que constituye la exposición permanente al herbicida. Para conocer si tienen el potencial para ser usados en un proceso tecnológico de biorremediación, es necesario saber cuáles son las especies que los componen y cómo se comportarían en condiciones ambientales variables tales como las que experimentarían en un sistema de descontaminación.

Esta tesis propone determinar la composición de los consorcios SAC1 y SAC25 y su capacidad metabólica en distintas condiciones de crecimiento. También, se pretende conocer cómo afecta la temperatura y la presencia de nitrato en la estructura de los consorcios y en su estabilidad funcional. Esto permitirá conocer si estos consorcios son herramientas aptas para desarrollar un proceso biotecnológico destinado a mitigar la contaminación por atrazina en aguas, suelos o en un biorreactor. La realización del trabajo contribuye a caracterizar recursos naturales autóctonos y conocer su potencial para biorremediar ambientes contaminados con atrazina.

[27]

# 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Determinar la composición y evaluar algunos factores que influyen en la estabilidad de consorcios bacterianos degradadores de atrazina.

#### 2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Determinar la riqueza y abundancia de las especies que componen los consorcios estables seleccionados previamente, mediante técnicas moleculares y técnicas de cultivo tradicionales.
- **2.2.2.** Detectar cuáles son los genes de la vía de degradación de atrazina que están presentes en cada aislamiento de estos consorcios estables.
- 2.2.3. Evaluar si la temperatura y la presencia de nitrato inciden en el mantenimiento de la capacidad degradadora y en la estructura de los consorcios.

# 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Reactivos químicos

La atrazina comercial 90% de pureza (Novazina 90 GD) fue adquirida de Agritec S.A. Los estándares de atrazina 99% de pureza (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-s-triazina), hidroxiatrazina 99% de pureza (2-hidroxi-atrazina) y ácido cianúrico 98% de pureza (1,3,5-s-triazina-2,4,6-triol) calidad ppa fueron adquiridos de Sigma–Aldrich Chemical Co. La etilamina fue adquirida de PDH Prolabo.

#### 3.2. Medios de cultivo

Los consorcios degradadores de atrazina y las cepas se repicó en tubos de vidrio (de 20 mL) con tapa rosca y septo de goma de butilo conteniendo 8 mL de medio de cultivo líquido mineral mínimo MDA estéril (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 18 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 mM pH 7.2, trazas minerales 5 mL L<sup>-1</sup>, acetato de sodio 0.7 mM, ácido succínico 0.7 mM, citrato de sodio 0.7 mM, solución de vitaminas 0.9X, CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1mM y atrazina comercial 1 o 25 mg L<sup>-1</sup> dependiendo el ensayo). El medio base (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, trazas minerales y atrazina) se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos, el resto de los componentes se esterilizó con filtro estéril de 0.45  $\mu$ M y se agregó al medio base luego de autoclavado. El medio líquido mineral mínimo MDC se preparó de la misma forma que el medio MDA pero sustituyendo atrazina por 25 mg L<sup>-1</sup> de ácido cianúrico como única fuente de nitrógeno (Bellini et al. 2014). El medio líquido mineral mínimo con atrazina más etilamina MDAE se preparó agregando al medio MDA con 25 mg L<sup>-1</sup> de atrazina, el volumen necesario de una solución de etilamina previamente esterilizada

por filtración hasta llegar a una concentración final de 8 mg L<sup>-1</sup> (proporción de atrazina:etilamina ~ 3:1) y se agregó sólo citrato de sodio como fuente de carbono y energía en proporciones 30:1 de C:N. En los ensayos en presencia de una fuente de nitrógeno adicional, se usó el medio MDA o MDC con el agregado de KNO<sub>3</sub> (29 mg L<sup>-1</sup> de nitrato) de forma tal que la cantidad de átomos de N del nitrato fuera equimolar a la cantidad de N que aporta la molécula de atrazina o ácido cianúrico. En este caso se agregó el doble de fuente de carbono y energía con el fin de mantener la misma proporción de C:N. Los medios sólidos se hizo agregando 22 g L<sup>-1</sup> de agar Difco<sup>TM</sup> al correspondiente medio líquido pero con 500 mg L<sup>-1</sup> de atrazina comercial (MDAA), 500 mg L<sup>-1</sup> de ácido cianúrico (MDCA) y 500 mg L<sup>-1</sup> de atrazina comercial más 170 mg L<sup>-1</sup> de etilamina (MDAEA). En MDAA y MDCA las fuentes de carbono y energía fueron las mismas que en los medios líquidos (acetato de sodio, ácido succínico y citrato de sodio respetando las proporciones 30:1 de C:N). El MDAEA se suplementó con citrato de sodio respetando las mismas proporciones de C:N. La pureza de las cepas se confirmó en placas de R2A agar Difco<sup>TM</sup>.

#### 3.3. Determinación de atrazina y sus metabolitos por HPLC

La atrazina se determinó por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Performance) con una columna C18 y un detector UV a 222 nm (Bellini et al. 2014). Los metabolitos de degradación hidroxiatrazina y ácido cianúrico se determinó por HPLC-UV con una columna C8 a 220 nm (Da Cunha et al. 2013). Previo a la inyección, se tomó 0.5 mL de medio de cultivo en condiciones estériles y se centrifugó a 11000 g durante 10 minutos guardando el sobrenadante. Las alícuotas que no se midieron en el momento se congelaron en viales de vidrio protegidos de la luz a -20°C. Se realizó curvas de calibración con estándares de atrazina, hidroxiatrazina y ácido cianúrico (Figura 3.1). Cada punto de la curva se midió por triplicado. Las ecuaciones de la recta calculadas mediante el método de mínimos cuadrados fueron: y = 324 x + 15 (R<sup>2</sup> = 0.999) para concentraciones entre 0.5 y 32 mg L<sup>-1</sup> de atrazina, y = 112 x + 10 (R<sup>2</sup> = 0.996) e y = 483 x – 197 (R<sup>2</sup> = 0.995) para concentraciones entre 0.5 y 20 mg L<sup>-1</sup> de hidroxiatrazina y ácido cianúrico respectivamente.



**Figura 3.1**. Curvas de calibración de los estándares de atrazina, hidroxiatrazina y ácido cianúrico. Las barras de error indican el desvío estándar (DS) de al menos tres medidas, excepto los señalados (\*) en los que se realizó sólo una medida y por lo tanto no se pudo calcular el DS.

#### 3.4. Determinación de nitrato

La concentración de nitrato se estimó mediante las tiras reactivas Nitrate-Nitrite Test Sticks (Quantofix <sup>®</sup>, Macherey-Nagel, Dueren, Germany).

#### 3.5. Determinación de la biomasa

El crecimiento de microorganismos se siguió midiendo la densidad óptica de la muestra a una longitud de onda de 600 nm (DO<sub>600</sub>). El equipo utilizado fue un espectrofotómetro Spectronic Genesis 5. La medida se tomó directamente del tubo de vidrio conteniendo la muestra previamente agitada en vortex durante 20 segundos. Cuando la muestra se incubó en frasco, se tomó una alícuota de 1 mL y se midió en cubeta de plástico. Se realizó un blanco con el mismo medio que la muestra pero sin inocular con microorganismos.

#### 3.6. Consorcios bacterianos y muestreo

Los consorcios de bacterias degradadoras de atrazina SAC1 y SAC25 fueron obtenidos previamente, a partir de lodos de una piscina de decantación de la planta potabilizadora de agua ubicada en Aguas Corrientes, Uruguay en el año 2010 (Bellini et al. 2014). Durante ese período, se había detectado en algunas oportunidades, bajas concentraciones de atrazina en el agua proveniente del Río Santa Lucía, que ingresa a la planta potabilizadora (OSE, com. pers.). Los consorcios SAC1 y SAC25 fueron seleccionados mediante subcultivos sucesivos en presencia de atrazina como única fuente de nitrógeno a una concentración de 1 mg  $L^{-1}$  y 25 mg  $L^{-1}$  respectivamente, hasta que se mantuvieron estables (15° subcultivo). El 15° subcultivo de cada consorcio se purificó por diluciones hasta extinción y se conservó liofilizado durante largos períodos de tiempo en medio MDA con el agregado de glicerol 5% (m/v) previamente esterilizado por filtración (Bellini et al. 2014). Luego de su liofilización, se recuperó los consorcios resuspendiendo el polvo liofilizado en medio MDA con 1 mg L<sup>-1</sup> de atrazina (SAC1) y 25 mg L<sup>-1</sup> (SAC25), e incubando con agitación a 120 rpm, durante 24-48 hs, a 30°C, en oscuridad. Se guardó a temperatura ambiente y se subcultivó en las mismas condiciones para su mantenimiento en cortos períodos de tiempo.

Se realizó un nuevo muestreo en octubre de 2011 en las plantas potabilizadoras de agua de OSE ubicadas en Aguas Corrientes (AC), ciudad de Dolores (D) y ciudad de Florida (F) de Uruguay. Los cursos de agua que abastecen a estas dos últimas son los ríos San Salvador y Santa Lucía Chico respectivamente. Las tres plantas potabilizadoras de agua se encuentran en zonas de fuerte actividad agrícola y en el agua que ingresa se detectó trazas de atrazina esporádicamente en algún momento previo al muestreo (OSE, com. pers.). Las muestras se tomaron del agua que ingresa a la planta (R) en los tres sitios (AC, D y F), en puntos donde aún no habían recibido ningún tratamiento de potabilización. Se transportaron refrigeradas, en botellas de vidrio color ámbar, de 4 litros, previamente esterilizadas, sin cámara de aire. Una vez en el laboratorio, las muestras se procesaron el mismo día iniciando el ensayo en microcosmos.

#### 3.7. Extracción del ADN total

Se extrajo el ADN total utilizando el kit para extracción de ADN de cepas puras Gram positivas y negativas de Promega (Wizard© Genomic DNA Purification Kit) siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor. La extracción se realizó a partir de la biomasa obtenida luego de centrifugar (a 10.000 g, 10 minutos) entre 3.5 y 6 mL de cultivo fresco de los consorcios o de las cepas puras en medio líquido MDA, MDC, MDAE o MDA con nitrato, según el ensayo. El ADN obtenido luego de la extracción se resuspendió en 50 µL de agua mQ y se almacenó en tubos eppendorf a -20°C. Se verificó la pureza del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa 0.9%.

# 3.8. Determinación de la composición de los consorcios por clonado del gen *ARNr16S* y análisis por ARDRA

La composición de los consorcios SAC1 y SAC25 se determinó mediante la construcción y análisis de bibliotecas usando secuencias del gen ARNr16S. La PCR se realizó de la extracción del ADN total de los consorcios purificados (15° subcultivo) previo a la liofilización, en las mismas condiciones que se describió para el T-RFLP en Bellini et al. 2014. Se hizo duplicados de cada reacción de PCR en un volumen final de 25 µL. Los cebadores fueron 27f (3'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 5') y 1492r (3'ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT 5'). El ciclo de la PCR fue el mismo excepto que el paso de extensión final fue de 15 min a 72°C. El tamaño de los productos de amplificación (1465 pb) se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los duplicados de la misma muestra se mezclaron, se ligaron a plásmidos y se clonaron en células electrocompetentes de Escherichia coli TOP10 Electrocomp™ usando el Kit TOPO TA Cloning para Secuenciado (Invitrogen), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor. Se verificó el tamaño del inserto por PCR usando los cebadores T3-T7 provistos por el kit en 40 clones de la biblioteca de SAC1 y 45 clones de SAC25. Cada amplicón T3-T7 se analizó por ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) usando las enzimas de restricción *Hha*l (Fermentas) y *Msp*l (Fermentas) (Bellini et al. 2014). Los patrones de restricción de los clones fueron analizados con el programa Gel Compar 4.2 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), usando el algoritmo UPGMA para

análisis de grupos. Cada grupo con un mismo patrón se definió como una OTU (Unidad Taxonómica Operacional, en inlgés). El esfuerzo de muestreo se evaluó calculando las curvas de rarefacción para cada biblioteca genómica mediante el uso del programa libre Analytic Rarefaction 1.3 (http://www.uga.edu/ ~strata/software/), desarrollado por Steven Holland y se calculó el porcentaje de cobertura mediante la fórmula C =  $[1 - (n_1 \times N^{-1})] \times 100$ , donde  $n_1$  es el número de OTUs compuestas por una única secuencia y N es el número total de secuencias analizadas (Wagner et al. 2002). Adicionalmente, se calculó los índices de diversidad de Shannon (H) y Simpson (D) mediante las fórmulas H =  $-\sum [(n_i/n) \times \ln(n_i/n)] y D = \sum (n_i/n)^2$ , donde n es el número total de individuos y  $n_i$  es el número de individuos del taxón i.

#### 3.9. Análisis de la estructura por T-RFLP del gen ARNr16S

Los consorcios SAC1 y SAC25 posteriores a la liofilización se analizaron por T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Lenght Polymorphism) del gen *ARNr16S*. También se analizó con esta técnica los enriquecimientos incubados en presencia de nitrato y a distintas temperaturas. El T-RFLP se realizó en idénticas condiciones que se describe en Bellini et al. 2014 usando las enzimas de restricción *Hha*l y *Msp*I.

Se usó los datos estandarizados de la abundancia relativa de cada T-RF para hacer el análisis de cluster UPGMA con el índice de similitud Morisita, mediante el programa de uso libre PAST 2.1 (http://folk.uio.no/ohammer/past/).

### 3.10. Aislamiento de cepas degradadoras de atrazina y de los intermediarios de biodegradación

Se llevó a cabo distintas estrategias con el fin de aislar cepas de los consorcios SAC1 y SAC25 posteriores a la liofilización, que participen en distintos pasos de la vía. Se tomó una alícuota de 1 mL de un cultivo líquido de SAC1 y SAC25 en MDA durante la fase exponencial de crecimiento y se realizó diluciones seriadas en una solución estéril de NaCl 0.9%. Se sembró 0.1 mL de las diluciones -4, -5 y -6 en la superficie de placas con medio MDAA. De la misma forma, se realizó el ensayo pre-incubando a cada consorcio en MDC y MDAE y luego sembrando las mismas diluciones en placas de MDCA y MDAEA respectivamente. Las placas de agar se incubaron entre 4 y 10 días a 30°C. Se eligió colonias de distinta morfología en las que se amplificó por PCR el gen *trzN* si la colonia provenía de MDAA y el gen *trzD* si provenía de MDCA. La PCR se llevó a cabo en las mismas condiciones que se describe en la sección 3.12, excepto que se realizó directamente de la biomasa de la colonia en lugar de hacer una extracción de ADN. El primer paso del ciclo, en este caso, se extendió a 15 minutos para permitir la lisis celular. Las colonias que dieron positivo para el gen *trzN* o *trzD* se subcultivó respectivamente a medio líquido MDA (25 mg L<sup>-1</sup> de atrazina) y MDC (25 mg L<sup>-1</sup> de ácido cianúrico) y se analizó por ARDRA de la misma forma que se hizo en el clonado. Las colonias que crecieron en MDAEA fueron analizadas directamente por ARDRA y se subcultivó a MDAE. La pureza de todos las cepas se verificó sembrando en medio no selectivo R2A agar Difco y observando en microscopio de contraste de fases.

#### 3.11. Secuenciado del gen ARNr16S y análisis filogenético

Se eligió el gen *ARNr16S* de un clon representativo de las OTUs más abundantes y de algunas cepas para su secuenciación. Se usó el servicio Macrogen Sequencing Service, Korea, que cuenta con un secuenciador ABI PRISM 3730XL. Una vez obtenidas, se comparó su similitud con secuencias conocidas de la base de datos del GenBank usando la herramienta BLASTn (Basic Local Aligment Search Tool; Altschul et al. 1990). Para la construcción del árbol filogenético se realizó un alineamiento múltiple con el método de MUSCLE implementado en el programa MEGA5. En el alineamiento se incluyó las secuencias de los clones y cepas obtenidos de SAC1 y SAC25 y secuencias de referencia homólogas tomadas del GenBank. El árbol filogenético se estimó con el método de Neighbor-Joining con el modelo algorítmico de p-distance implementado en el programa MEGA5. La confiabilidad de las ramas del árbol filogenético se determinaron con el análisis de bootstrap en base a la evaluación de 1000 repeticiones.

## 3.12. Detección molecular de los genes de la vía de degradación de atrazina

La presencia de los genes atzA, atzB, atzC, atzD, trzN y trzD se detectó mediante amplificación por PCR usando los mismos cebadores y condiciones de amplificación que se describe en Bellini et al. (2014). La reacción se realizó usando como molde 2.5 μL de la extracción de ADN total de las cepas aisladas de los consorcios SAC1 y SAC25 o de los enriquecimientos obtenidos del muestreo de 2011. Como control positivo se usó ADN extraído de la cepa Pseudomonas ADP para los genes atz y Arthrobacter sp. para los genes trz, donadas por Mark Radosevich. El tamaño esperado de cada amplicón (0.4 kb para trzN, 0.5 kb para atzA, atzB y trzD, y 0.6 kb para atzC y atzD), se confirmó por electroforesis en gel de agarosa 1.5% (Agarosa I, Amaresco) diluido en buffer TBE 0.5X, conteniendo bromuro de etidio (concentración final de 0.5 µg mL<sup>-1</sup>) o GelRed 0.25X a 100V durante 35 minutos. Se usó como patrón de peso molecular el marcador GeneRuler 50bp (Fermentas). En cada carril del gel se cargó 3-4 µL de muestra más 1 µL de buffer de corrida y se corrió a 100 V durante 30 minutos. Las bandas se visualizaron con un transmisor UV/Vis. Se eligió algunos amplicones para su secuenciación usando el servicio prestado por Macrogen, Korea con el fin de confirmar el gen buscado. Las secuencias fueron analizadas comparándolas con secuencias conocidas de la base de datos del GenBank usando la herramienta BLASTn.

#### 3.13. Perfil de acumulación de metabolitos

La curva de degradación de atrazina y acumulación de los metabolitos hidroxiatrazina y ácido cianúrico se determinó inoculando con un 5% (v/v) de cultivo fresco (menor a 24 hs) del consorcio SAC25 posterior a la liofilización, tres réplicas de medio MDA con 25 mg L<sup>-1</sup> de atrazina. Las condiciones de incubación fueron las que se describió en la Sección 3.6. En paralelo, se llevó a cabo controles, por triplicado, inoculando con microorganismos el mismo medio pero sin atrazina, de forma tal que no contuviera ninguna fuente de nitrógeno. Se midió periódicamente la concentración de atrazina, hidroxiatrazina y ácido cianúrico por HPLC-UV, y la OD<sub>600</sub> en cada réplica. El mismo
ensayo se realizó con las cepas M11a3, E17a2 y M3b1.2.1, en estos casos no se determinó hidroxiatrazina.

#### 3.14. Curvas de crecimiento en atrazina y ácido cianúrico

La habilidad de crecer en presencia de atrazina o ácido cianúrico como única fuente de nitrógeno se determinó inoculando MDA (25 mg L<sup>-1</sup> de atrazina) o MDC (25 mg L<sup>-1</sup> de ácido cianúrico), con un alícuota de un cultivo fresco de células hasta llegar a una  $OD_{600}$  de 0.02. Se realizó triplicados para cada cepa y se comparó con los consorcios SAC1 y SAC25 posteriores a la liofilización. En paralelo se realizó controles sin fuente de nitrógeno inoculando células en el mismo medio pero sin atrazina o ácido cianúrico respectivamente. Se midió la  $OD_{600}$  periódicamente con el fin de seguir el crecimiento. Se midió la concentración de atrazina y ácido cianúrico inicial y final por HPLC-UV.

# 3.15. Ensayo en microcosmos para seleccionar nuevas bacterias degradadoras de atrazina en distintas temperaturas y fuentes alternativas de nitrógeno

Para determinar si las muestras de agua obtenidas en el muestreo de 2011 en los distintos sitios (AC, D y F) contenían microorganismos con capacidad degradadora de atrazina, se llevó a cabo un ensayo en microcosmos. Se realizó distintos tratamientos, que consistieron en probar si se puede obtener microorganismos degradadores de atrazina en presencia de una fuente alternativa de nitrógeno (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y a una temperatura de incubación que se aproxime a la temperatura ambiente (20°C). En la Tabla 3.1 se resume los tratamientos realizados en cada muestra. Las bacterias presentes en el agua que ingresa a la planta se concentraron 30 veces centrifugando 2 litros (6000 g, 10 min.) en tubos estériles (Falcon). El pellet acumulado luego de sucesivas centrifugaciones se resuspendió en el mismo agua de donde procedía la muestra y se subdividió en los distintos tratamientos. Se usó 70 mL de inóculo resuspendido para sembrar frascos de vidrio (220 mL) que contenían 70 mL de una solución estéril de buffer fosfato (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, conc. final, pH 7.2) con atrazina comercial (doble concentración) de forma tal de obtener una

concentración final de 20 mg L<sup>-1</sup>. Los frascos correspondientes al tratamiento con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> además de atrazina, contenían KNO<sub>3</sub> de forma tal que la cantidad de átomos de nitrógeno que aporta la atrazina sea igual a la del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (29 mg L<sup>-1</sup> conc. final). Todos los tratamientos se suplementó con una mezcla previamente esterilizada por filtración de sustratos carbonados (metanol, succinato de sodio y acetato de sodio) en una proporción 30:1 de C:N. Se incubó en shaker con agitación orbital a 100 rpm, en oscuridad, a 20°C o a 30°C según el tratamiento. Al mismo tiempo se incubó controles estériles para cada una de las muestras (previamente esterilizados en autoclave a 121°C, 20 minutos) con el fin de verificar que la desaparición de atrazina era de origen biológico. Se midió DO<sub>600</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y atrazina a los 0, 4, 8, 11, 27 y 88 días de incubación.

Tabla 3.1. Condiciones ensayadas en las muestras de agua tomadasde las plantas potabilizadoras de Dolores, Aguas Corrientes y Florida

Tratamiento	Atrazina (mg L <sup>-1</sup> )	$NO_{3}^{-}$ (mg L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)
20	20	-	20
20-N	20	29	20
30	20	-	30
30-N	20	29	30
Control estéril	20	29	30

# 3.16. Enriquecimientos sucesivos en presencia de nitrato y a distintas temperaturas

Se buscó ver el efecto que podrían tener estos factores en los microorganismos luego de subcultivarlos sucesivamente en las distintas condiciones que se planteó anteriormente. Se eligió los enriquecimientos obtenidos del muestreo 2011 que degradaron atrazina en el ensayo en microcosmos en el menor período de tiempo. Adicionalmente se incluyó el consorcio SAC25 con el fin de probar estas condiciones en un consorcio estable. Los repiques sucesivos se realizaron en tubos de vidrio conteniendo 8 mL de medio de cultivo estéril MDA con 20 mg L<sup>-1</sup> de atrazina comercial. Sólo en los tratamientos con nitrato se preparó el medio con el agregado de 29 mg L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Tanto en los enriquecimientos provenientes del muestreo del año 2011 como

en SAC25 se mantuvo las mismas fuentes de carbono que se usó desde el inicio (acetato de sodio, ácido succínico y metanol en el primer caso y acetato de sodio, ácido succínico y citrato de sodio en el segundo caso) en proporciones 30:1 de C:N. Los repiques sucesivos se inoculó con el 5% (v/v) y se incubó el tiempo necesario hasta que consumieron la atrazina. Una vez verificado esto, se repicó nuevamente al mismo medio de cultivo manteniendo siempre las mismas condiciones de incubación. Se consideró que un sistema era estable cuando se pudo verificar el mismo porcentaje de degradación de atrazina y la misma DO<sub>600</sub>, luego de un tiempo de incubación similar, en al menos tres repiques sucesivos. Los casos en los que no se pudo verificar degradación, se intentó recuperar la actividad desde algún repique anterior que hubiera degradado atrazina.

# 4. Resultados

### 4.1. Estructura y composición de los consorcios SAC1 y SAC25

La estructura y composición de los consorcios SAC1 y SAC25 se abordó mediante el uso de técnicas moleculares (clonado y T-RFLP) y técnicas de cultivo tradicionales.

#### 4.1.1. Clonado del gen ARNr16S y análisis de ARDRA

Esta técnica permitió determinar la riqueza y abundancia relativa de las especies que componen los consorcios SAC1 y SAC25, mediante la construcción de bibliotecas genómicas del gen *ARNr16S*. Se analizó por ARDRA 40 clones del consorcio SAC1 y 45 clones del consorcio SAC25 previos a ser liofilizados (Anexo I). Los clones con un perfil de ARDRA similar se agruparon con el algoritmo UPGMA en una misma OTU.

Se encontró que el consorcio SAC1 está compuesto por 9 OTUs y SAC25 por 11 OTUs distintas, tres de ellas comunes a ambos (Figura 4.1). Los resultados mostraron que la OTU número 1 es dominante en las dos bibliotecas, representada con el 33 % del total de clones analizados en SAC1 y el 64 % en SAC25. Las OTUs número 2 y 3 también aparecieron en los dos consorcios, pero representadas con el 25 y el 15 % en SAC1 y el 2 % en SAC25. Las principales diferencias halladas en la composición de SAC1 y SAC25 con esta técnica se encontró en las OTUs menos abundantes. El cálculo del índice de Shannon (H) indica que la biblioteca del consorcio SAC1 es más diversa que la de SAC25 (H = 1.8 y 1.4, respectivamente). El índice de Simpson (D) confirma lo que se observa en la Figura 4.1, donde SAC1 tiene menor dominancia que SAC25 (D = 0.21 y 0.43, respectivamente).

La cantidad de clones analizados fue adecuada para estimar el número de OTUs, ya que ambas curvas de rarefacción se acercan a la asíntota (Figura 4.2). El porcentaje de cobertura calculado fue C= 90 % en SAC1 y C= 87 % en SAC25.



**Figura 4.1**. Distribución de OTUs en los consorcios degradadores de atrazina SAC1 y SAC25 previos a la liofilización obtenidas luego de analizar por ARDRA las bibliotecas del gen *ARNr16S*.



**Figura 4.2**. Curvas de rarefacción de las bibliotecas del gen *ARNr16S* de cada consorcio. La cobertura (%) calculada fue C = 90 % para SAC1 y C = 87 % para SAC25.

Se eligió un clon que representara a las OTUs número 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12 y 13 para su secuenciación y se comparó con secuencias de la base de datos usando la herramienta BLAST (Tabla 4.1). La secuencia de la OTU 1 más abundante en las bibliotecas dio una alta similitud con la secuencia del gen *ARNr16S* de *Aminobacter cicenorei* C147 (AF246220). Las secuencias de las OTUs número 2 y 3, presentes en ambos bibliotecas aunque en menor

# proporción, fueron similares a las de *Variovorax paradoxus* NBRC15149 (NR 113736) y Rhizobium subbaranois JC85 (NR109061) respectivamente.

Tabla 4.1. Resumen del análisis de ARDRA e identificación de los clones de los consorcios degradadores de atrazina SAC1 ySAC25 previos a la lioilización.

Consorcio original	Clon	OTU <sup>1</sup>	Cepa tipo más cercana según el gen ARNr16S (% similitud) [Accession Number] <sup>2</sup>	T-RF in si	ilico (pb)
				Hhal	Mspl
SAC1	2a, 3a, 6a, 7a, 9a, 12a, 19a, 21a, 27a, 30a, 37a, 39a, 40a	1	Aminobacter cicenorei C147 (99%) [AF246220]	61	401
	11a, 15a, 18a, 22a, 25a, 29a, 33a-36a	2	Variovorax paradoxus NBRC15149 (99%) [NR113736]	67	491
	23a, 38a	3	Rhizobium subbaranois JC85 (100%) [NR109061]	61	401
	4a, 14a, 17a, 24a, 28a	4	Pseudomonas sagittaria CC-OPY-7 (96%) [NR117838]		
	23a, 38a	5	Ochrobactrum daejeonense MJ11 (99%) [NR109061]	61	401
	20 a	6	-	-	-
	8a	7	-	-	-
	1a	8	-	-	-
	32a	9	-	-	-
SAC25	2b, 5b-8b, 10b, 11b, 17b, 20b-26b, 28b-32b, 34b, 37b-45b	1	Aminobacter cicenorei C147 (99%) [AF246220]	61	401
	12b	2	Variovorax paradoxus NBRC15149 (99%) [NR113736]	67	491
	35b	3	Rhizobium subbaranois JC85 (100%) [NR109061]	61	401
	9b, 15b, 36b	10	<i>Pseudomonas</i> sp. DH53Y (98%) [EU545155]	207	490
	13b, 14b, 16b	11	Agrobacterium tumefaciens IAM12048 (99%) [NR041396]	399	127
	18b, 27b	12	Curvibacter fontanus AQ9 (97%) [NR112221]	207	490
	30b, 33b	13	Hydrogenophaga atypica BSB 41.8 (98%) [NR029023]	205	488
	1b	14	-	-	-
	3b	15	-	-	-
	4b	16	-	-	-
	19b	17	-	-	-

<sup>1</sup> Los clones que tuvieron perfiles de ARDRA con una similitud mayor al 90% en el análisis de agrupamiento UPGMA, se definieron en una misma OTU.

<sup>2</sup> Se secuenció un clon representativo de cada OTU y e analizó por BLAST. (-) indica que esa OTU no se secuenció.

## 4.1.2. Análisis de los consorcios por T-RFLP del gen ARNr16S

El análisis de T-RFLP permitió conocer la estructura de los consorcios mediante una técnica distinta. La digestión con la enzima *Msp*I, reveló que los consorcios SAC1 y SAC25 posteriores a la liofilización están integrados por 7 a 10 picos distintos, cinco de los cuales están presentes en los dos consorcios (Figura 4.3a). El pico correspondiente

a un fragmento de 398-399 pb fue mayoritario en los dos consorcios, mientras que en SAC25 se observó además un segundo pico mayoritario de 65-67 pb.

En el análisis con la enzima de restricción *Hha*I se observó entre 7 a 10 picos distintos, cuatro de los cuales están presentes en ambos consorcios (Figura 4.3b). Los picos mayoritarios en SAC1 fueron los correspondientes a los fragmentos de restricción de 58-61 pb y 92-95 pb, mientras que en SAC25 los mayoritarios con esta enzima fueron los fragmentos de 58-61 pb y 74-76 pb.



**Figura 4.3.** Estructura de los consorcios SAC1 y SAC25 posteriores a su liofilización, basada en el análisis de T-RFLP del gen *ARNr16S* digerido con la enzima de restricción *Msp*I (a) y *Hha*I (b). La abundancia de cada T-RF fue calculada expresando la altura de cada pico como porcentaje de la suma total de picos en cada muestra. El índice de Shannon dio S = 1.3 (SAC1) y S = 1.5 (SAC25) con la enzima *Msp*I y S = 1.5 (SAC1) y S = 1.3 (SAC25) con la enzima *Msp*I y D = 0.29 (SAC25) con la enzima *Msp*I, y D = 0.29 (SAC1) y D = 0.34 (SAC25) con la enzima *Hha*I.

## 4.1.3. Aislamiento e identificación de cepas degradadoras de atrazina y sus intermediarios metabólicos.

Se llevó a cabo una estrategia que consiste en utilizar intermediarios de la vía de degradación de atrazina como única fuente de N para aislar cepas de los consorcios que participen en distintos pasos de la vía. Para ello se usó medios de cultivo que contenían como única fuente de nitrógeno: atrazina (MDAA), ácido cianúrico (MDCA) o atrazina y etilamina (MDAEA). Se eligió un total de 63 colonias del consorcio SAC1 y 57 colonias del consorcio SAC25 entre los tres medios de cultivo, abarcando la mayor cantidad de morfologías distintas. En las colonias seleccionadas, se buscó la presencia del gen *trzN* que codifica para la enzima triazina-hidrolasa cuando la colonia provenía de MDAA y *trzD* que codifica para la enzima ácido cianúrico-amidohidrolasa si provenía de MDCA.

Del consorcio SAC1 se obtuvo dos (de 12) cepas que contenían el gen trzN en medio con atrazina y dos (de 34) cepas con el gen trzD en medio con ácido cianúrico. Las cepas que crecieron en atrazina tenían los perfiles de ARDRA número 18 y 19, mientras que en ácido cianúrico se encontró los perfiles 19 y 21 (Tabla 4.2). El análisis por BLAST de un fragmento de la secuencia del gen ARNr16S de un representante de cada grupo de ARDRA, indicó que los perfiles 18, 19 y 21 tienen una alta similitud con las secuencias de las cepas Arthrobacter ureafaciens (NR 029281.1), Pseudomonas citronellolis (NR 026533.1) У Ochrobactrum rhizosphaerae (NR 042600.1) respectivamente. Las 17 colonias de SAC1 que crecieron en medio con atrazina más etilamina agruparon en cuatro perfiles de ARDRA (18, 19, 22 y 23), dos de ellos distintos a los encontrados anteriormente. Los perfiles 22 y 23 dieron una alta similitud con las cepas Ancylobacter rudongensis (NR\_029047.1) y Achromobacter xylosoxidans (AB680773.1) respectivamente.

Del consorcio SAC25 se obtuvo diez (de12) cepas en MDAA que contenían el gen *trzN*. Estas cepas agruparon en los perfiles de ARDRA número 18 encontrado también en SAC1 y número 20, exclusivo de este consorcio, el cual dio un 99 % de similitud con la secuencia de *Xanthobacter aminoxidans* (NR\_025172.1). Las catorce (de 30) cepas en MDCA que tenían el gen *trzD* agruparon en los perfiles 20, 21, 22 y 23, todos ellos

[44]

encontrados previamente en SAC1. En el medio con atrazina más etilamina se obtuvo

15 cepas que presentaron los perfiles 20, 22 y 23, previamente observados.

Ninguno de los perfiles ARDRA de las cepas coincidió con el perfil del clon 1 dominante en las bibliotecas.

Tabla 4.2.	Identificación	de algunas cepas	representativas a	aisladas de los	consorcios d	legradadores de	e atrazina S	AC1 Y
SAC25 lue	go de la liofiliza	ación.						

Consorcio original	Cepa <sup>1</sup>	Perfil de ARDRA	Cepa tipo más cercana según el gen <i>ARNr16S</i> (% similitud) [Accession Number] <sup>2</sup>	T-RF in s	<i>silico</i> (pb)
-				Hhal	Mspl
SAC1	M11a3, E17a2	18	Arthrobacter ureafaciens (98-99 %) [NR_029281.1]	78	67
	M4a2.2, C3a2, E12a	19	Pseudomonas citronellolis (99 %) [NR_026533.1]	155	490
	C3a1	21	Ochrobactrum rhizosphaerae (98 %) [NR_042600.1]	61	401
	E5a	22	Ancylobacter rudongensis (98 %) [NR_029047.1]	61	128
	E10a	23	Achromobacter xylosoxidans (99 %) [AB680773.1]	155	490
SAC25	M3b1.2.1	18	Arthrobacter ureafaciens (99 %) [NR_029281.1]	78	67
	M5b1.1.1, C23b2, E9b	20	Xanthobacter aminoxidans (99 %) [NR_025172.1]	61	401
	C5b2	21	Ochrobactrum rhizosphaerae (98 %) [NR_042600.1]	61	401
	C12b3, E7b	22	Ancylobacter rudongensis (98 %) [NR_029047.1]	61	128
	C20b1, E14b	23	Achromobacter xylosoxidans (99 %) [NR_044925.1]	155	490

<sup>1</sup> Los medios de cultivo usados fueron MDAA, MDCA y MDAEA que contienen como única fuente de nitrógeno atrazina, ácido cianúrico y atrazina más etilamina respectivamente. Las cepas que comienzan con la letra M, C o E respectivamente según el medio de cultivo en el que fueron aislados.

<sup>2</sup> De acuerdo al BLAST, basado en 900–1100 bp.

### 4.1.4. Análisis filogenético del gen ARNr16S

Con las secuencias representativas de las OTUs número 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12 y 13 se realizó un alineamiento múltiple incluyendo además las secuencias de las cepas y secuencias tomadas de la base de datos del GeneBank y se construyó un árbol filogenético del gen *ARNr16S* (Figura 4.4). El árbol filogenético obtenido por el método Neighbour-Joining mostró que ambos consorcios están compuestos por bacterias Gram negativas de las clases *Alfa, Beta* y *Gamaproteobacteria,* así como por bacterias Gram positivas de la clase *Actinobacteria*. Las técnicas de clonado y aislamiento por cultivo revelaron distintos miembros de los consorcios. La única especie que se detectó tanto en la biblioteca como por aislamiento fue *Ochrobactrum* sp. de SAC1.



**Figura 4.4.** Árbol filogenético del gen *ARNr16S* (367 pb) calculado por el método de Neighbour Joining. Se incluyó secuencias de los clones (triángulos) y cepas (círculos) de los consorcios SAC1 (violeta) y SAC25 (verde) y secuencias de la base de datos GenBank (identificadas con el accession number). (\*) Indica las secuencias que pertenecen a una misma OTU según el análisis de ARDRA. En cada rama están los valores de bootstrap calculados de 1000 repeticiones. La barra indica porcentaje de divergencia.

### 4.2. Caracterización metabólica de los consorcios

## 4.2.1. Detección molecular de los genes de la vía de degradación de atrazina

El estudio del potencial genético de las cepas en combinación con los ensayos de crecimiento a partir de distintos intermediarios metabólicos de la vía, nos permiten conocer la función que podría cumplir cada cepa en el consorcio. Los genes que se amplificó fueron *trzN*, *atzB* y *atzC* que codifican para las hidrolasas que eliminan cada uno de los tres sustituyentes del anillo de la atrazina, y *trzD* que codifica para la enzima que inicia la hidrólisis del ácido cianúrico. Los genes *atzA* y *atzD* no se buscó en las cepas ya que no se encontró en los consorcios originales SAC1 y SAC25 (Bellini et al. 2014).

Tabla 4.3. Dete	ción de los	genes de la	a vía de de	egradación	de atrazina	en las cepas	obtenidos de los
consorcios SAC	y SAC25 a j	partir de dis	tintos inte	ermediarios	metabólicos	5.	

Consorcio	Nombre de la especie	Сера	Sustrato <sup>1</sup>	Geno	Gen de la vía de la atrazina <sup>2</sup>				
				trzN	atzB	atzC	trzD		
SAC1	Arthrobacter ureafaciens	M11a3	Atz	+	+	+	-		
		E17a2	Etil+Atz	+	+	+	-		
	Pseudomonas citronellolis	M4a2.2	Atz	+	+	+	+		
		C3a2	Cian	-	-	+	+		
		E12a	Etil+Atz	-	-	-	+/-		
	Ochrobactrum rhizosphaerae	C3a1	Cian	+	-	+	+		
	Ancylobacter rudongensis	E5a	Etil+Atz	-	-	-	+		
	Achromobacter xylosoxidans	E10a	Etil+Atz	-	-	-	-		
SAC25	Arthrobacter ureafaciens	M3b1.2.1	Atz	+	+	+	-		
	Xanthobacter aminoxidans	M5b1.1.1	Atz	+	-	+	+		
		C23b2	Cian	-	-	+	+		
		E9b	Etil+Atz	-	-	-	+		
	Ochrobactrum rhizosphaerae	C5b2	Cian	+	-	+	+		
	Ancylobacter rudongensis	C12b3	Cian	+	-	+	+		
		E7b	Etil+Atz	-	-	-	+		
	Achromobacter xylosoxidans	C20b1	Cian	-	-	+	+		
		E14b	Etil+Atz	-	-	-	+		

<sup>1</sup> Atz: atrazina, Etil: etilamina, Cian: acido cianúrico fueron las únicas fuentes de nitrógeno disponibles en el medio de cultivo.

<sup>2</sup>+: positivo, -: negativo, +/-: algunas veces dio positivo y otras negativo.

Algunos productos de amplificación de los genes específicos se secuenció y las secuencias se comparó con secuencias de la base de datos del NCBI. Las secuencias del gen *trzN* dieron 99% de similitud con el gen *trzN* de *Nocardioides* sp. AN3 (AB427184.1) y las de *trzD* dieron 100% similares con el gen *trzD* de *Enterobacter cloacae* pPDL12 (AF342826.1).

Los resultados mostraron que algunas cepas de la misma especie tienen distinta composición de los genes metabólicos de atrazina, dependiendo de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo (Tabla 4.3). En las cepas identificadas como Pseudomonas citronellolis se detectó los genes trzN-atzBC-trzD cuando se aisló en atrazina (M4a2.2), atzC-trzD cuando se aisló en ácido cianúrico (C3a2) y algunas veces el gen trzD cuando se aisló en etilamina más atrazina (E12a). Del mismo modo, Xanthobacter aminoxidans tuvo los genes trzN-atzC-trzD cuando el sustrato fue atrazina (M5b1.1.1), atzC-trzD cuando fue ácido cianúrico (C23b2) y sólo trzD cuando fue etilamina más atrazina (E9b). Un comportamiento similar se encontró en Ancylobacter rudongensis (C12b3 y E7b) y Achromobacter xylosoxidans (C20b1 y E14b). A diferencia de lo que ocurrió anteriormente, todos las cepas Arthrobacter ureafaciens tuvieron la misma composición génica trzN-atzBC, independientemente de si fueron aisladas en atrazina (M11a3 y M3b1.2.1) o en etilamina más atrazina (E17a2). No se obtuvo ninguna cepa de esta especie en ácido cianúrico. Por último, Ochrobactrum rhizosphaerae se aisló solamente en medio con ácido cianúrico y en todas las cepas (C3a1 y C5b2) se detectó la composición génica *trzN-atzC-trzD*.

### 4.2.2. Perfil de acumulación de metabolitos.

Se analizó los intermediarios producidos por el consorcio SAC25 y las cepas *Arthrobacter* sp. M11a3, M3b1.2.1 y E17a2 durante la degradación de atrazina. En la Figura 4.5 se muestra la curva de acumulación de los metabolitos hidroxiatrazina y ácido cianúrico por el consorcio estable SAC25 durante la degradación de atrazina. La curva no se realizó para el consorcio SAC1 debido a que el límite de detección de los metabolitos no es lo suficientemente bajo como para cuantificarlos partiendo de 1 mg L<sup>-1</sup> de atrazina en el medio de cultivo.

[48]

El consumo de atrazina en el consorcio SAC25 ocurre aproximadamente hasta las 14 hs de incubación, con una velocidad promedio de degradación, calculada como la pendiente de la curva entre las 0 y 14 hs de (7.1±0.2) x10<sup>-3</sup> mM h<sup>-1</sup>. A medida que la atrazina se va consumiendo, aparecen en el medio de cultivo hidroxiatrazina y ácido cianúrico como metabolitos intermediarios de la vía. Ambos tienen su máxima concentración a las 14 hs (aprox.), cuando casi toda la atrazina del medio fue consumida. Luego de las 14 hs, tanto la hidroxiatrazina como el ácido cianúrico son degradados, sugiriendo que el consorcio podría llegar a completar la vía. La tasa de crecimiento se mantuvo constante hasta que se terminó de consumir todos los metabolitos alcanzando una DO<sub>600</sub> de 0.233±0.046, mientras que el control inoculado sin atrazina alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0.015±0.005.



**Figura 4.5.** Acumulación de metabolitos y biomasa por el consorcio bacteriano SAC25 durante la degradación de atrazina. Se muestra la curva de uno de los triplicados. Símbolos: atrazina ( $\blacklozenge$ ), hidroxiatrazina ( $\Box$ ), ácido cianúrico ( $\Delta$ ), DO<sub>600</sub> ( $\blacklozenge$ ).

Las cepas del género Arthrobacter fueron uno de los pocos con la capacidad de crecer en atrazina ya que contienen los genes que inician la vía de degradación y que pudieron mantenerse activos. Las cepas M11a3 y M3b1.2.1, luego de una breve fase *lag*, consumieron toda la atrazina en un período de 20 hs de incubación. Si bien en este caso la velocidad de degradación sólo se pudo estimar, fue similar a la velocidad del consorcio SAC25 (Figura 4.6). La pendiente de la curva estimada entre las 14 y 21 hs es entre (9-10±2) x10<sup>-3</sup> mM h<sup>-1</sup>. Además se observó acumulación de ácido cianúrico en el medio de cultivo, confirmando la incapacidad de las cepas de esta especie para degradar el principal intermediario de la vía. Este resultado está en concordancia con la ausencia del gen *trzD* en *Arthrobacter sp.*, por lo que era esperable observar este comportamiento. También se realizó el mismo ensayo en la cepa E17a2 en el que se observó un comportamiento igual al de M11a3 y M3b1.2.1.



**Figura 4.6.** Acumulación de ácido cianúrico por *Arthrobacter* sp. durante la degradación de atrazina en las cepas M11a3 (a) y M3b1.2.1 (b). Se muestra un perfil representativo de las tres réplicas. Símbolos: atrazina ( $\blacklozenge$ ), ácido cianúrico ( $\Delta$ ), DO<sub>600</sub> ( $\blacklozenge$ ), no se cuantificó hidroxiatrazina en este caso.

#### 4.2.3. Crecimiento a partir de atrazina y ácido cianúrico

Tanto las cepas Ochrobactrum sp. C3a1 y C5b2 como Xanthobacter sp. C23b2 crecieron en presencia de ácido cianúrico y degradaron más del 91% de este metabolito durante su incubación (35 hs) (Figura 4.7).

El mismo ensayo en medio MDA con 25 mg L<sup>-1</sup> de atrazina como fuente de nitrógeno, no mostró diferencias en el crecimiento respecto al control sin fuente de nitrógeno. Las cepas C3a1 y C5b2 alcanzaron absorbancias alrededor de 0.05 tanto en atrazina como en su control, mientras que para C23b2 la absorbancia fue cercana a 0.1 en ambos. Tampoco se observó degradación de atrazina (0-3%), por lo que a pesar de tener el gen *trzN*, estas cepas no son capaces de iniciar la hidrólisis de la atrazina cuando están aisladas.

Las cepas *Ancylobacter* sp. C12b3, *Achromobacter* sp. C20b1 y *Pseudomonas* sp. M4a2.2 y C3a1 no pudieron mantenerse activas por lo que no pudo determinarse su crecimiento en ninguno de los sustratos.



**Figura 4.7.** Curvas de crecimiento en medio MDC con ácido cianúrico (25 mg L<sup>-1</sup>) como única fuente de nitrógeno. Se muestra una de las tres réplicas ensayadas para cada cepa o consorcio. Los respectivos controles sin fuente de nitrógeno estuvieron en todos los casos por debajo de los 0.12 de absorbancia.

#### 4.3. Efecto del nitrato y la temperatura en la degradación de atrazina

En esta sección se evaluó el efecto de dos factores, temperatura y presencia de una fuente alternativa de nitrógeno, en la capacidad degradadora de atrazina. Para ello, se realizó ensayos en microcosmos con muestras obtenidas en el año 2011. Los enriquecimientos que tuvieron la capacidad de degradar atrazina aún en presencia de nitrato y a dos temperaturas diferentes, se sometieron a los mismos factores de selección durante varios subcultivos sucesivos con el fin de probar su estabilidad. También se subcultivó el consorcio SAC25, lo que permitió evaluar si la capacidad

degradadora de atrazina se mantiene estable bajo esas condiciones de crecimiento. Por último se analizó la estructura de la comunidad de los consorcios adaptados a estas condiciones.

#### 4.3.1. Ensayos en microcosmos en diferentes condiciones

Los microcosmos mostraron que los microorganismos presentes en las muestras del agua de Aguas Corrientes (RAC) y Dolores (RD) pueden degradar atrazina y  $NO_3^{-1}$  cuando ambos están presentes como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo (Figura 4.8). Tanto en RAC como en RD, la degradación de atrazina en presencia de  $NO_3^{-1}$ , ocurrió a 30°C y a 20°C aunque fue más lenta a 20°C. Como puede observarse, a 30°C (con  $NO_3^{-1}$ ) se consumió la atrazina (88-91%) en 8 días de incubación, mientras que a 20°C se alcanzó un porcentaje similar (92-100%) recién a los 88 días.



**Figura 4.8.** Degradación de atrazina en los microcosmos incubados en distintas condiciones con agua de las plantas potabilizadoras de Aguas Corrientes (RAC) y Dolores (RD). Símbolos: sólo con atrazina (sin relleno), con atrazina y  $NO_3^-$  (con relleno), a 20°C (triangulo) y a 30°C (círculo). Las muestras de Florida (RF) y los controles esterilizados no degradaron atrazina en los 88 días de incubación (no se muestra los datos).

En RD los microcosmos incubados sólo en presencia de atrazina, consiguieron degradarla (> 92%) tanto a 20°C como a 30°C en un período de 8 y 11 días de

incubación respectivamente. Sin embargo, los resultados en RAC sólo en presencia de atrazina no mostraron degradación en ninguna de las dos temperaturas. Las muestras provenientes de Florida no degradaron atrazina en ninguno de las condiciones ensayadas. Los controles esterilizados mantuvieron la misma concentración de atrazina durante los 88 días de incubación, por lo que se descarta la posibilidad de que haya desaparición de atrazina por hidrólisis química, fotólisis o algún otro factor abiótico.

# 4.3.2. Mantenimiento de la capacidad degradadora en sucesivos subcultivos

Se evaluó si era posible seleccionar, a partir de los microcosmos activos, enriquecimientos de microorganismos capaces de mantener la misma velocidad de degradación. Se eligieron los microcosmos que degradaron atrazina en el menor tiempo de incubación (8 y 11 días) y se subcultivaron sucesivamente manteniendo las mismas condiciones que el tratamiento inicial, hasta observar un comportamiento estable. Lo mismo se realizó con el consorcio SAC25 (obtenido y mantenido a 30°C en un medio sin nitrato), con el fin de probar su habilidad de degradar atrazina bajo condiciones más próximas a las que operarían en el ambiente en un proceso de biorremediación.

Los resultados mostraron que RD y RAC mantienen su actividad degradadora de atrazina en las distintas condiciones, hasta un determinado número de subcultivo (Tabla 4.4). Una vez que se alcanza este número de repique los enriquecimientos seleccionados pierden o disminuyen considerablemente la capacidad de degradar atrazina. Se intentó recuperar su actividad volviendo a distintos subcultivos anteriores que habían sido conservados a temperatura ambiente, pero no se pudo recuperar un enriquecimiento activo en ninguno de los casos. En algunos subcultivos de estos enriquecimientos se realizó la amplificación de los genes de la vía de la atrazina y se cuantificó los metabolitos presentes en el medio de cultivo. Además se estudió la estructura de la comunidad seleccionada mediante T-RFLP del gen *ARNr16S*, los resultados obtenidos se muestran en la sección 4.3.3

[53]

Tabla 4.4. Porcentaje de degradación de atrazina en los subcultivos sucesivos incubados a 20 o a 30°C en presencia o en ausencia de nitrato. El tiempo de incubación entre repiques sucesivos fue entre 24 y 33 hs excepto en los que se muestra en paréntesis (días).

		20°C				30°C		
N° de	A	tz	$Atz + NO_3$	ŀ	Atz		Atz + NO <sub>3</sub>	
subcultiv	RD	SAC25	SAC25	RD	SAC25	RD	RAC	SAC25
0								
1	91 (2)	98	97	99 (3)	100	100 (3)	96 (3)	100
2	92 (5)	97	88	88 (2)	98	68 (2)	99 (2)	100
3	87 (3)	98	99	93 (5)	87	Nd	97 (4)	62
4	100 (4)	Nd	99	1 (7)	Nd	91 (2)	100 (4)	96
5	96 (3)	Nd	100		98	100 (2)	95 (3)	100
6	91 (4)	100	98		98	88 (3)	96 (3)*	Nd
7	93 (3)	100	100		97	100 (2)	94 (7)*	100
8	88 (3)*	Nd	100		Nd	94*	17 (11)*	100
9	87 (4)	100	95		100	58 (4)*		100
10	80 (4)	97	100		Nd	0 (7)*		100*
11	83 (6)	85	Nd		100			
12	97 (4)*	100*	84		100			
13	Nd		100*		100*			
14	Nd							
15	42 (30)*							

Agua que ingresa a la planta de Dolores (RD), agua que ingresa a Aguas Corrientes (RAC), consorcio SAC25. Nd: no determinado. Negrita: último subcultivo realizado. (\*) Subcultivos que se seleccionó para posteriores análisis.

El consorcio SAC25 pareció ser el más estable, ya que mantuvo la capacidad degradadora de atrazina en todas las condiciones, en al menos 10 subcultivos sucesivos. Se alcanzó el mismo porcentaje de degradación, en un tiempo similar de incubación, entre un subcultivo y el siguiente. El nitrato se consumió en el mismo tiempo que la atrazina, cuando se puso en el medio de cultivo como fuente alternativa de N. Uno de los subcultivos de SAC25 a 30°C con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> perdió capacidad de degradar atrazina, pero se pudo recuperar la actividad volviendo a un subcultivo anterior. Se analizó la estructura del consorcio SAC25 adaptados a degradar atrazina en las distintas condiciones por T-RFLP del gen *ARNr16S*.

### 4.3.3. Análisis de los consorcios obtenidos en distintas condiciones

Se eligieron algunos subcultivos de RD y RAC de forma tal que comprendieran la transición desde que estuvieron activos hasta que perdieron capacidad de degradar

atrazina en las distintas condiciones (Tabla 4.4). En ellos se buscó detectar la presencia de los genes de la vía catabólica de atrazina y se cuantificó los metabolitos acumulados luego de su incubación.

En los repiques 8°, 12° y 15° de RD incubados a 20°C (RD20) se detectó los genes *trzN-atzBC*, mientras los repiques 8° y 9° de RD incubados a 30°C con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (RD30-N) se detectó además el gen *trzD*. En este último, el siguiente repique (10° subcultivo) que perdió capacidad de degradar atrazina no se detectó el gen *trzN* y se acumuló atrazina en el medio.

En los subcultivos activos (6° y 7°) de RAC a 30°C con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (RAC30-N) se detectó los genes *trzN-atzBC*, pero en el siguiente subcultivo (8°) que perdió actividad degradadora no se detectó el gen *trzN* y también se acumuló atrazina.

Tabla 4.5. Detección de los genes de la vía de degradación de atrazina y cuantificación de los metabolitos en los enriquecimientos obtenidos de las muestras RD y RAC.

Enriquecimiento	Subcultivo	Gen de la vía de la atrazina					Cor	ncentración final (I	mM)	
	N°	atzA	trzN	atzB	atzC	atzD	trzD	Atrazina	Hidroxiatrazina	Cianúrico
RD20	8	-	+	+	+	-	-	0.009	0.001	0.026
	12	-	+	+	+	-	-	0.002	0.002	0.032
	15	Nd	+	Nd	+	-	-	0.051	Nd	Nd
RD30-N	8	-	+	+	+	-	+	0.000	0.006	0.009
	9	Nd	+	+	+	-	+	0.032	0.010	0.064
	10	Nd	-	Nd	+	-	+	0.077	Nd	Nd
RAC30-N	6	-	+	+	+	-	-	0.002	0.002	0.010
	7	Nd	+	+	+	-	-	0.006	0.008	0.030
	8	Nd	-	Nd	+	-	-	0.064	0.002	0.008

Símbolos: negativo (-), positivo (+), no determinado (Nd). La concentración inicial de atrazina teórica es 0.09 mM.

El análisis de cluster usando los perfiles de T-RFLP obtenidos con la enzima *Hha*I, nos permitió comparar la estructura bacteriana de los enriquecimientos seleccionados en cada caso. En el enriquecimiento RD20 se puede observar que los subcultivos activos (8° y 12°) son idénticos pero muy distintos al subcultivo inactivo (15°; Figura 4.9). En el enriquecimiento RD30-N se puede ver un cambio en la composición de bacterias, que va siendo gradual desde el 8° subcultivo activo hasta el 10° subcultivo inactivo. Este último tiene una alta similitud con el subcultivo que perdió actividad a 20°C. Los repiques de RAC30-N agrupan en un cluster distinto que los de Dolores en las mismas

condiciones. El 6° repique de RAC30-N el cual mantiene su actividad tiene una composición similar a los enriquecimientos activos de Dolores incubados a 20°C.



**Figura 4.9.** Dendrograma obtenido por el método UPGMA que muestra el agrupamiento y porcentajes de similitud de los perfiles de T-RFLP obtenidos con la enzima de restricción *Hha*I en los enriquecimientos de Dolores y Aguas Corrientes incubados en distintas condiciones. Se muestra distintos subcultivos de Dolores a 20°C (D20), a 30°C con nitrato (D30-N) y Aguas Corrientes a 30°C con nitrato (AC30-N).

El consorcio SAC25 mostró ser el más estable en las distintas condiciones. También se analizó por T-RFLP con el fin de evaluar si debido a las condiciones de incubación, hubo cambios en la composición de bacterias. El análisis de T-RFLP con la enzima *Mspl* mostró que los consorcios adaptados a 20 y 30°C tienen una composición similar con la presencia de dos T-RFs predominantes (Figura 4.10). El pico de 65-67 pb es el que está en mayor proporción, según el análisis *in silico* se podría asociar con la especie *Arthrobacter* sp. (Tabla 4.2). El segundo pico más abundante es el de 399-400 pb. Este pico podría asociarse a algunos de los miembros del grupo  $\alpha$ -*Proteobacteria*, como *Aminobacter* sp., *Ochrobactrum* sp, *Xanthobacter* sp. y *Sinorhizobium* sp., ya que la digestión *in silico* de sus secuencias con la misma enzima de restricción, da un T-RFs teórico de 401 pb.



**Figura 4.10**. Estructura de la comunidad bacteriana basada en el análisis de T-RFLP del gen *ARNr16S* digerido con la enzima de restricción *Msp*I, en los enriquecimientos de SAC25 adaptados a degradar atrazina en distintas condiciones. Se analizó el 12° subcultivo incubado a 20°C (20), 13° subcultivo a 20°C con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (20-N), 13° subcultivo a 30°C (30), 10° subcultivo a 30°C con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (30-N). La abundancia relativa de cada T-RF fue calculada expresando la altura de cada pico como porcentaje de la suma total de picos en cada muestra.

Los enriquecimientos con nitrato tuvieron una composición similar tanto a 20°C como a 30°C pero muy distinto al los consorcios adaptados sólo en presencia de atrazina como fuente de nitrógeno. Aparece un pico dominante de 487-490 pb que podría asociarse a bacterias de las clases *Beta* y *Gamaproteobacteria* como *Pseudomonas sp., Achromobacter* sp. y *Variovorax* sp. (Tabla 4.2).

El análisis de cluster con los perfiles de T-RFLP confirmó que los enriquecimientos de SAC25 adaptados a crecer a 20° y a 30°C se parecen en su composición de bacterias (Figura 4.11). Sin embargo, la composición bacteriana de los enriquecimientos de SAC25 obtenidos en presencia de nitrato como fuente de nitrógeno, tienen una baja similitud comparada con la composición de bacterias del consorcio adaptado en atrazina como única fuente de N.



**Figura 4.11.** Dendrograma obtenido por el método UPGMA que muestra el agrupamiento y porcentajes de similitud de los perfiles de T-RFLP (*Msp*I) del consorcio SAC25 subcultivado a dos temperaturas (20 y 30) y en presencia de nitrato (20-N y 30-N).

### 4.3.4. Crecimiento de SAC25 en ácido cianúrico

Este ensayo mostró que los últimos subcultivos de SAC25 seleccionados bajo las distintas condiciones de incubación (temperatura y  $NO_3^{-1}$ ) tuvieron la capacidad de crecer a partir de ácido cianúrico. Las  $DO_{600}$  de los subcultivos manteniendo las mismas condiciones de incubación pero en medio con 25 mg L<sup>-1</sup> de ácido cianúrico, dieron mayor en todos los casos que su respectivo control sin fuente de nitrógeno (Tabla 4.6). En los subcultivos donde se había agregado nitrato como fuente alternativa, se realizó un control con el agregado de  $NO_3^{-1}$  en cantidades equimoleculares de nitrógeno. En este caso se observó que el crecimiento fue aproximadamente el doble.

Tabla 4.6. Crecimiento en ácido cianúrico de los consorcios bacterianos de SAC25 adaptados a distintas condiciones, medido como DO<sub>600</sub> (promedio ± desvío estándar de tres réplicas).

Muestra (subcultivo)	Tiempo de incubación (h)	Cianúrico	Cianúrico+NO <sub>3</sub>	Control sin N
20 (12°)	42	0.342 ± 0.009	-	0.083 ± 0.016
20-N (13°)	42	0.222 ± 0.019	$0.416 \pm 0.014$	0.070 ± 0.018
30 (13°	20	$0.326 \pm 0.011$	-	0.073 ± 0.014
30-N.1 (10°)	20	$0.350 \pm 0.011$	$0.480 \pm 0.030$	0.082 ± 0.016

# 5. Discusión

La atrazina es uno de los herbicidas con mayor riesgo de contaminar reservas de agua. Tiene una alta prevalencia de uso, alta movilidad en suelos y moderada persistencia en el ambiente, por lo que es frecuente detectarla en reservas de agua que pueden ser fuente para el suministro de la población. Comparada con la información disponible de suelos, existen pocos trabajos que estudien bacterias degradadoras de atrazina en sitios que hayan tenido una baja presión de selección por el herbicida, como en los cursos de agua (Satsuma 2009; Douglass et al. 2015). En general, los intentos de enriquecimientos que hay hasta la fecha, se han realizado de sitios contaminados por largos períodos de tiempo, lo que implica una selección previa de la microbiota natural al herbicida (Devers et al. 2007a; Kolic et al. 2008; Mandelbaum et al. 1995; Strong et al. 2002; Wang et al. 2014). Es relevante conocer en mayor profundidad el potencial biodegradador de atrazina en ecosistemas menos expuestos al herbicida. En este trabajo se obtuvo consorcios y enriquecimientos de bacterias capaces de degradar atrazina bajo distintas condiciones, a partir de muestras que estuvieron expuestas temporalmente a bajas concentraciones del herbicida.

Se estudió la composición y el metabolismo de dos consorcios bacterianos degradadores de atrazina que habían sido enriquecidos previamente del lodo de una planta potabilizadora de agua, seleccionados a dos concentraciones distintas del herbicida (Bellini et al. 2014). El consorcio SAC25 siempre estuvo expuesto a una concentración de atrazina cercana a su solubilidad máxima en agua (25 mg L<sup>-1</sup>), mientras que SAC1 estuvo expuesto a una concentración lo más baja posible, pero aun detectable según nuestros métodos de cuantificación (1 mg L<sup>-1</sup>). Esto nos permitió

[59]

saber si existen diferencias entre dos consorcios cuando baja la concentración de atrazina.

#### 5.1. Composición y diversidad de los consorcios estables

Teniendo en cuenta los resultados del clonado del gen *ARNr16S* y las cepas, se observó que SAC1 y SAC25 son consorcios relativamente complejos, compuestos por especies, pertenecientes a las clases *Alfa*, *Beta* y *Gamaproteobacteria*, y a la clase *Actinobacteria* (Figura 4.4). Entre las dos técnicas, los consorcios están integrados por 14 (SAC1) y 15 (SAC25) miembros. El análisis de T-RFLP del gen *ARNr16S* en conjunto con la información de las secuencias del clonado y las cepas, permitió tener un abordaje de la estructura de los consorcios.

El clonado reveló varias diferencias en la composición de los dos consorcios, tanto cualitativas como cuantitativas. Las curvas de rarefacción y los índices de diversidad calculados de las bibliotecas del gen *ARNr16S*, indicarían que SAC1 tiene una diversidad mayor y una dominancia menor que SAC25. Este aspecto también se vio reflejado en el T-RFLP con la enzima *Hha*I ya que el índice de diversidad fue S = 1.5 en SAC1 y S = 1.3 en SAC25, y el índice de dominancia D = 0.29 en SAC1 y D = 0.34 en SAC25. Es posible que la exposición repetida a una concentración baja de atrazina como es 1 mg L<sup>-1</sup>, ejerza una presión de selección baja sobre los microorganismos y que por lo tanto los distintos miembros se vean representados con una mayor similitud. Un efecto similar se observó en el trabajo de Kolic et al. (2011), donde la comunidad degradadora que evolucionó luego de ser incubada en 100 mg L<sup>-1</sup> de atrazina, fue menos diversa que la comunidad inicial incubada a 25 mg L<sup>-1</sup>. A pesar que los 100 mg L<sup>-1</sup> de atrazina superan ampliamente la solubilidad de la molécula en agua, los resultados estarían de acuerdo con que la diversidad de especies suele ser baja en ambientes que son fuertemente controlados por un factor.

En contraposición con los resultados del clonado, las técnicas de cultivo mostraron una única diferencia entre un consorcio y otro. Las cepas *Pseudomonas* sp. sólo se aisló de SAC1 y *Xanthobacter* sp. sólo se aisló de SAC25, mientras que el resto de las cepas se encontraron en ambos consorcios.

[60]

Teniendo en cuenta las tres técnicas, clonado, asilamiento y T-RFLP, la clase Alfaproteobacterias fue la que estuvo representada en un mayor número de familias y en mayor proporción relativa en ambos consorcios (Figura 4.2 y 4.3). La secuencia de la OTU 1, que tuvo un 99% de similitud con Aminobacter cicenorei C147 (AF246220) (Topp et al. 2000), fue dominante en ambas bibliotecas, aunque está en mayor proporción relativa en SAC25 que en SAC1. Otras OTUs menos dominantes como la OTU 3, 5 y 11 que tuvieron secuencias similares a *Rhizobium subbaraonis* (NR108508), Ochrobactrum daejeonense (NR109061) y Agrobacterium tumefaciens (NR041396) respectivamente también forman parte de la case Alfaproteobacterias. Por aislamiento se obtuvo cepas del género Xanthobacter sp. exclusivamente de SAC25, Ochrobactrum sp. y Ancylobacter sp. aisladas de ambos consorcios. El análisis de T-RFLP del gen ARNr16S refleja lo observado en el clonado y en cultivo. La digestión con la enzima Mspl, dio un T-RF de 388-399 pb en gran proporción tanto en SAC1 (68%) como en SAC25 (39%). Este pico podría asociarse a los miembros Aminobacter sp., Sinorhizobium sp., Xanthobacter sp. y Ochrobactrum sp., ya que la digestión in silico de sus secuencias con la misma enzima da como resultado un T-RF teórico de 401 pb (Tabla 4.2a; Schüte et al. 2008). El análisis con la enzima Hhal también indicó la presencia de un T-RF de 58-61 pb en gran proporción en SAC1 (37%) y SAC25 (48%), que podría asociarse a las mismas especies mencionadas anteriormente y a Ancylobacter sp. que tienen un T-RF teórico de 61 pb con esta enzima (Tabla 4.2b).

La OTU número 1 aunque fue la más abundante en ambas bibliotecas, no se pudo aislar. Los medios de cultivo con atrazina y ácido cianúrico que se usó en este trabajo, tienen una composición similar a los que se usó en otros trabajos donde se aisló cepas de *Aminobacter* sp. (Topp et al. 2000; Rosseaux et al. 2001). Tampoco se tuvo éxito con la tercer estrategia, en la que se agregó etilamina además de atrazina al medio de cultivo, aunque está reportado que *Aminobacter* sp. puede usar ambos compuestos como fuente de C y N (Topp et al. 2000). Una posibilidad es que la cepa que está presente en estos consorcios utilice otros intermediaros de la vía para crecer. Por ejemplo, en el caso que tuviese sólo los genes *atzB* o *atzC* podría utilizar hidroxiatrazina o N-isopropilamida como fuente de nitrógeno. Hay reportes donde se obtuvo distintas cepas muy similares a la secuencia encontrada en este trabajo, en las

[61]

que se detectó combinaciones diversas de los genes metabólicos, tales como atzC-trzD en Aminobacter aminovorans Ep2-1c, atzA en Pseudaminobacter sp. C155, atzAC en Pseudaminobacter sp. C160 y atzABC en Aminobacter cicenorei C147 (Mc Donlad et al. 2005; Rosseaux et al. 2001; Topp et al. 2000). Estos autores encontraron que los genes se localizan en plásmidos y que serían susceptibles de perderse en forma individual, por lo que las distintas cepas pueden presentar una gran variedad de combinaciones de los genes catabólicos de atrazina. Otra explicación posible podría estar en las condiciones de liofilización. Teniendo en cuenta que el clonado se realizó de los consorcios purificados previos a su liofilización mientras que las cepas y el T-RFLP se realizaron de los consorcios recuperados luego de la liofilización, el proceso podría haber afectado más a este microorganismo que al resto. En tal caso, Aminobacter sp. no sería un miembro clave en el consorcio, ya que la velocidad de degradación no se vio afectada luego de la liofilización.

En el grupo de las *Betaproteobacterias* no hubo coincidencias entre los resultados obtenidos por clonado y por aislamiento. La OTU número 2, presente en las bibliotecas de los dos consorcios, tuvo una alta similitud con algunas secuencias del género *Variovorax*. Los otros clones, presentes en menor proporción sólo en SAC25, fueron similares a *Curvibacter* y a *Hydrogenophaga*. Por aislamiento se obtuvo cepas del género *Achromobacter* de ambos consorcios.

El grupo de las *Gamaproteobacterias* lo componen distintos miembros del género *Pseudomonas* con diferencias en las secuencias obtenidas por clonado y por cultivo. Esto se observó también en el análisis de ARDRA ya que las cepas mostraron un perfil distinto al de los clones.

En el análisis de T-RFLP con la enzima *Msp*I se detectó la presencia de un pico de 488-490 pb en ambos consorcios aunque en baja proporción y con la enzima *Hha*I un pico de 153-156 pb en SAC1. El T-RFs de 488-490 podría asociarse a cualquiera de los clones o cepas que componen el grupo *Beta y Gamaproteobacteria* ya que la digestión *in silico* de sus secuencias da un T-RF teórico de 490 pb (*Msp*I) mientras que el T-RF de 153-156 pb podría asociarse a la cepa *Achromobacter* sp. cuya digestión *in silico* de un T-RF de 155 pb (*Hha*I).

[62]

El único miembro Gram positivo fue *Arthrobacter* sp. de la clase *Actinobacteria* aislado de los dos consorcios. Si bien no se detectó una secuencia similar en las bibliotecas, el análisis de T-RFLP dio un pico de 74-76 pb con la enzima *Hha*I y otro de 65-67 pb con la enzima *Msp*I, ambos abundantes en SAC25, que podrían asociarse a las cepas de Arthrobacter sp.

Las coincidencias entre las especies encontradas por cultivo y por clonado fueron pocas. Las cepas de *Ochrobactrum* sp. aisladas en este trabajo y *Shinorizobium sp.*, aisladas previamente de los consorcios SAC1 y SAC25 (Bellini et al. 2010) fueron las únicas que se detectó mediante clonado. Esta observación, destaca aun más que los análisis moleculares proveen una imagen distinta de la comunidad respecto a la que se obtiene con los métodos tradicionales de cultivo. Durante la construcción de las bibliotecas del gen *ARNr16S* hay pasos de extracción de ADN, PCR y clonado que imprimen sesgos en cuanto a la composición original de la comunidad bacteriana (Acinas et al. 2005). Se asume que el sesgo tiene el mismo efecto en todas las muestras pero pasa a ser relevante cuando se compara con otras técnicas. Del mismo modo, las técnicas de aislamiento por cultivo están fuertemente condicionadas a los distintos requisitos nutricionales de los microorganismos y a las condiciones de incubación.

El resto de las cepas, a pesar de que podrían tener un rol relevante en la degradación de atrazina, ya que poseen los genes catabólicos de degradación y fueron aisladas en medios de cultivo con atrazina o intermediaros de la vía como fuente de N, no se vieron representadas en el clonado. Es esperable pensar que las especies activas sean las más abundantes en el consorcio. Sin embargo, en varios enriquecimientos obtenidos de sitios altamente contaminados con atrazina, se observó que la abundancia relativa de los genes catabólicos de la vía de atrazina respecto al gen *ARNr16S* era del 0.5-4 % (Kolic et al. 2008; Kolic et al. 2010). Si bien hay especies que tienen más de una copia del gen *ARNr16S*, esta baja proporción indicaría que sólo un subgrupo muy pequeño de la comunidad tiene el potencial de degradar atrazina. Este podría ser uno de los motivos por los que no se alcanzó a ver representadas las cepas en las bibliotecas. En tal caso sería necesario analizar una mayor cantidad de clones.

En su mayoría, las especies que componen los consorcios SAC1 y SAC25 fueron reportadas en trabajos previos en los que se realizados de sitios altamente

[63]

contaminados por atrazina (Ghosh et al. 2009; Kolic et al. 2008; Martin-Laurent et al. 2006; Smith et al. 2005).

#### 5.2. Caracterización metabólica

El consorcio SAC25 fue eficiente en degradar atrazina, en 14 hs consumió casi el 100 % de la atrazina y en 44 hs casi el total del ácido cianúrico generado (Figura 4.5). La curva de acumulación de metabolitos confirma que la degradación de atrazina transcurre por la vía hidrolítica, a través de los intermediarios hidroxiatrazina y ácido cianúrico.

En el primer paso, catalizado por la enzima triazina hidrolasa (TrzN), podrían participar todas las cepas aisladas, ya que en todas se detectó el gen *trzN*. Sin embargo, únicamente en *Arthrobacter* sp. se confirmó que la enzima está funcionalmente activa mediante el ensayo de crecimiento en atrazina. El segundo paso, que consiste en eliminar el grupo etilamino, catalizado por la enzima AtzB, sólo lo podría realizar *Arthrobacter sp.*, ya que ninguna otra cepa de SAC25 tiene el gen *atzB*. En la hidrólisis del grupo isopropilamino, catalizada por la enzima amidohidrolasa AtzC, potencialmente podrían participar todas las cepas que contengan el gen *atzC*, aunque sólo en *Arthrobacter* sp. se pudo verificar indirectamente por los metabolitos de degradación de la atrazina, que la enzima estaba activa. Estos resultados indican que *Arthrobacter* sp. podría tener un rol importante en el inicio de la vía de degradación de atrazina hasta ácido cianúrico.

La segunda fase de la vía comienza con la hidrólisis del ácido cianúrico por acción de la enzima hidrolasa TrzD. El gen *trzD* se detectó en todas las cepas excepto en *Arthrobacter* sp. y por lo tanto todas serían potencialmente hábiles para romper el anillo del ácido cianúrico. La capacidad para degradar el ácido cianúrico estaría distribuida en una mayor diversidad de especies. Se pudo confirmar que tanto *Ochrobactrum* sp. como *Xanthobacter* sp. pueden crecer con ácido cianúrico como fuente de N. Estas dos especies podrían estar cumpliendo un rol importante en la segunda fase de la vía, permitiendo iniciar la hidrólisis del ácido cianúrico que eventualmente podría terminar en CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> (Figura 5.1).

[64]

Es probable que el consorcio SAC1 funcione de una forma similar, ya que posee prácticamente las mismas especies con la excepción de *Pseudomonas sp.*, al igual que *Arthrobacter* sp., tendría la capacidad de iniciar la vía de degradación.



**Figura 5.1**. Hipótesis de funcionamiento del consorcio SAC25. Al lado de cada paso de la vía de degradación se indican las cepas en las que se detectaron los genes de la vía y en negrita se señalan las cepas en las que además se probó que la enzima estuviera activa.

Una de las características que se observó es que la distribución de los genes en las distintas cepas muestra que las especies se complementan para completar la vía, similar al consorcio de ocho miembros reportado por Smith et al. (2005). En nuestro caso, como mínimo tienen que haber dos especies activas en el consorcio si se quiere llegar a los últimos pasos de la vía, como *Arthrobacter* sp. y *Ochrobactrum* sp. o la

primera y *Xanthobacter* sp. Al mismo tiempo, se observó que hay redundancia funcional, ya que más de una especie tiene el potencial de realizar un mismo paso de la vía. Esto podría ser una ventaja a la hora de aplicarlo como inóculo en biorremediación, debido a que hay mayor probabilidad de que alguna especie permanezca activa frente a condiciones ambientalmente variables.

La presencia de TrzN sugiere además, que los consorcios SAC1 y SAC25 podrían tener la capacidad de metabolizar otros compuestos de la familia de las s-triazinas ya que la especificidad de sustrato de esta enzima es bastante más amplia que la de AtzA (Shapir et al. 2005; Strong et al. 2002). Se demostró que la enzima TrzN purificada de *Arthrobacter aurescens* TC1, es capaz de hidrolizar 22 compuestos s-triazínicos y pirimidínicos distintos, incluyendo algunas s-triazinas que tienen los grupos F, CN, SCH<sub>3</sub>, S(O)CH<sub>3</sub>, y OCH<sub>3</sub> como sustituyentes (Shapir et al. 2005). El consorcio M3-T, compuesto por bacterias similares a las que se encontró en SAC1 Y SAC25 (*Arthrobacter* sp., *Ochrobactrum* sp., y *Pseudomonas* sp.), también puede degradar terbutilazina además de atrazina usando la vía *trzN-atzBC-trzD* (Jurina et al. 2014; Kolic et al. 2003).

Fue interesante observar que en algunas especies los genes catabólicos parecerían ser poco estables, ya que algunos de ellos no se detectó cuando se hizo crecer las cepas en una fuente alternativa de N. Esto podría deberse a que frecuentemente los genes se encuentran insertos en plásmidos, rodeados por secuencias de inserción IS y por lo tanto sujetos a sufrir eventos de conjugación y rearreglos de los genes. Esta plasticidad génica es la que ha permitido a los microorganismos adaptarse a degradar nuevos compuestos adquiriendo nuevos genes catabólicos (Changey et al. 2011; Martinez et al. 2001; Shapir et al. 2007). Como contrapartida, estos genes pueden perderse fácilmente si no se mantiene una presión de selección fuerte (Changey et al. 2011; Kolic et al. 2010). *Arthrobacter* sp. parecería ser la cepa más estable en este aspecto, ya que fue la única especie que mantuvo la misma composición de genes *trzN-atzBC* cuando se aisló en presencia de un fuente alternativa de N (etilamina) además de atrazina, mientras que otras cepas en este medio tuvieron menos genes que cuando se cultivó sólo en atrazina. La mayoría de los aislamientos de *Arthrobacter* sp. reportados hasta la fecha, degradan atrazina para dar el producto ácido cianúrico y tienen los

[66]

genes *trzN-atzBC*, generalmente localizados en un único plásmido (El Sebai et al. 2011; Strong et al. 2002; Sajjaphan et al. 2004; Zhang et al. 2011) o podrían estar en el cromosoma (Devers et al. 2007a). Solamente en la cepa *Arthrobacter* sp. MCMB-436, aislada por Vaishampayan et al. (2007), se detectó los genes *trzN-atzABCD* y el producto de la degradación de atrazina fue bi-urea.

Por el contrario, en las cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas en este trabajo se encontró distintas combinaciones de genes: *trzN-atzBC-trzD, atzC-trzD, trzD* o incluso ninguno de los genes cuando se cultivó en medios con una fuente alternativa de N. Esto indicaría que la capacidad degradadora de atrazina en las cepas de *Pseudomonas* es más lábil. En la mayoría de los trabajos donde se describe cepas de *Pseudomonas* sp. se encontró genes de la familia *atz* (de Souza et al. 1998 b; Bhardwaj et al. 2015) y con menor frecuencia se encontró genes de la familia *trz* como en nuestro caso (Kolic et al. 2007; Smith et al. 2005).

En este trabajo es la primera vez que se detecta genes del catabolismo de la atrazina en *Achromobacter* sp. (*atzC-trzD*) y en *Xanthobacter* sp. (*trzN-atzC-trzD*). También es novedosa la detección de genes de la familia *trz* en *Ancylobacter* sp. (*trzN-atzC-trzD*). Hasta el 2007, el gen trzN sólo se había encontrado en varias bacterias Gram positivas. Luego se empezó a encontrar en algunas Gram negativas como *Sinorhizobium* sp. NEA-B, *Polaromonas* sp. NEA-C (Devers et al. 2007a). Estos resultados sugieren que los genes catabólicos *trz* pueden estar presentes en otras especies Gram negativas, y que tal vez hayan sido adquiridos por transferencia horizontal.

Arbeli y Fuentes (2010) aislaron una cepa de *Ancylobacter* sp. de suelos colombianos en la que encontraron los genes *atzABCDEF*. *Achromobacter* sp. sólo fue reportada formando parte de una comunidad mineralizadora de atrazina enriquecida de una fábrica de atrazina, pero no se pudo determinar el rol que cumplía esta especie en la degradación de atrazina (Kolic et al. 2010). Casi no hay reportes donde se haya encontrado el género *Xanthobacter* vinculado a la degradación de atrazina. Se ha visto que *Xanthobacter* podría estar asociada a la degradación de atrazina *in situ* en un humedal artificial (Douglass et al. 2015), pero nunca se obtuvo aislamientos de este género que contuvieran alguno de los genes de la vía. La cepa que se aisló en el presente trabajo fue tan eficiente como *Ochrobactrum* sp. en degradar ácido cianúrico.

#### 5.3. Estabilidad bajo distintas condiciones

En este trabajo además se evaluó si la capacidad de degradar atrazina se mantiene estable en distintos enriquecimientos, luego de subcultivarlos sucesivamente en presencia de una fuente alternativa de nitrógeno y en dos temperaturas diferentes. En un experimento de estas características cabría esperar que en cada subcultivo nuevo, ocurra un evento de selección ligado a las condiciones de incubación, donde la composición de bacterias del consorcio cambia, hasta que la comunidad se estabiliza. Si el nuevo enriquecimiento puede adaptarse a las distintas condiciones impuestas, mantendría durante todos los subcultivos, la misma proporción de especies, los mismos genes, y la misma velocidad de degradación de atrazina.

Los enriquecimientos obtenidos a partir del agua de las plantas potabilizadoras de Dolores y de Aguas Corrientes perdieron estabilidad funcional y en la composición de bacterias, a partir de un determinado número de repique en el mismo medio de cultivo (Tabla 4.4). En los enriquecimientos activos de Dolores se encontró los genes trzN-atzBC cuando se incubó a 20°C, y cuando se incubó a 30°C con nitrato se detectó además el gen trzD. En estas últimas condiciones los enriquecimientos de Aguas Corrientes tenían sólo los genes trzN-atzBC (Tabla 4.5). En ninguna de las muestras se detectó los genes atzA ni atzD. Se ha visto que los genes trzN y trzD tienen una mayor prevalencia en los microorganismos del suelo, comparados a sus análogos atzA y atzD (Arbeli y Fuentes 2010; Devers et al. 2007a). En nuestro caso encontramos que también están dispersos en muestras de agua expuestas esporádicamente a atrazina. Esto podría deberse a que la enzima TrzN tiene algunas propiedades que le confieren una ventaja ecológica respecto a AtzA: tiene mayor velocidad, mayor afinidad por la atrazina y un rango de especificidad de sustrato mayor (Shapir et al. 2007; Kolic et al. 2012). El mejor desempeño de TrzN puede trasladarse también a la etapa de cultivo cuando atrazina es la única fuente de N, ya que las especies capaces de sintetizar esta enzima podrían crecer más rápido que las especies que tienen el gen atzA. En este caso habría una presión de selección durante el cultivo si se subcultiva en períodos reducidos de tiempo que termina dando como resultado un incremento en la población portadora del gen *trzN* (Arbeli y Fuentes 2010).

Las presencia de una fuente alternativa de N y temperatura seleccionaron dos enriquecimientos de Dolores que fueron distintos tanto en su composición de microorganismos como en su capacidad metabólica. La presencia del gen trzD sólo en una de las muestras de Dolores, podría deberse a que el crecimiento de los microorganismos portadores de este gen se haya visto favorecido cuando la temperatura es 30°C o por la presencia de nitrato, aunque esto sería válido sólo para las muestras de esa procedencia. El análisis de T-RFLP del gen *ARNr16S* de las muestras de Dolores (Figura 4.9), corrobora que las comunidades de microorganismos seleccionadas en las dos condiciones eran muy distintas cuando los enriquecimientos estaban activos.

Por otro lado, los enriquecimientos activos de Aguas Corrientes obtenidos en presencia de nitrato a 30°C, tienen la misma composición génica que la muestra de Dolores a 20°C (*trzN-atzBC*). El análisis del T-RFLP es concordante con este resultado, ya que las comunidades de ambos enriquecimientos muestran una alta similitud en su composición. No se obtuvio enriquecimientos de Aguas Corrientes a 20°C para comparar la composición génica y la comunidad que se hubiese seleccionado en estas condiciones, por lo que en este caso no podemos saber si hay un efecto de estos factores en la selección de microorganismos.

En dos de las muestras se observó que el último subcultivo perdió el gen *trzN*. Este podría ser el motivo que explique la incapacidad de los consorcios para degradar atrazina, ya que no contienen la enzima que inicia la hidrólisis de la molécula.

El consorcio SAC25 demostró ser el más estable en mantener la función degradadora de atrazina. Cuando se lo expuso a 20°C y en presencia de una fuente alternativa de nitrógeno, mantuvo la misma velocidad de degradación de atrazina durante todos los repiques sucesivos en cualquiera de las condiciones de degradación. Además también tuvo la capacidad de degradar ácido cianúrico en estas condiciones. Sin embargo, la composición del consorcio, tuvo cambios significativos cuando se lo incubó en

[69]

presencia de nitrato. El análisis de T-RFLP del gen ARNr16S indica que el nitrato induce a un aumento de las *Beta* y *Gamaproteobacterias* y una disminución de las *Alfaproteobacterias* y de *Arthrobacter*.

La capacidad de degradar atrazina en presencia de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> contrasta con reportes en donde se vio una disminución en la velocidad de degradación de la atrazina cuando hay presente en el medio otra fuente de nitrógeno que permite el crecimiento rápido de las células (García-González et al. 2003; Rhine et al. 2003). La posibilidad de tener algún consorcio que pueda degradar atrazina en presencia de nitrato resulta interesante desde el punto de vista biotecnológico ya que normalmente en ambientes acuáticos hay disponible más de una fuente de nitrógeno y además el nitrato en un contaminante común de aguas.

Este trabajo proporciona información detallada sobre la composición taxonómica y funcional de dos consorcios que mostraron ser estables y eficientes en degradar atrazina en presencia de una fuente alternativa de nitrógeno y a dos temperaturas.

# 6. Conclusiones

En este trabajo se pudo conocer la composición de dos consorcios bacterianos degradadores de atrazina y la capacidad de uno de ellos de metabolizar el herbicida cuando fue sometido a distintas condiciones. Los consorcios bacterianos previamente seleccionados a una concentración de atrazina cercana a su solubilidad máxima en agua (25 mg L<sup>-1</sup>) y a la mínima detectable con los métodos de cuantificación usados en este trabajo (1 mg L<sup>-1</sup>), difirieron en la composición de algunas especies como *Xanthobacter* sp. que sólo se encontró en SAC25 y *Pseudomonas* sp. exclusiva de SAC1. También difirieron en las proporciones relativas de algunos miembros como *Aminobacter sp.*, aunque de esta última no se pudo determinar el rol que cumple en el consorcio.

Se detectó los genes de la vía de degradación de atrazina (*trzN-atzBC-trzD*) en las distintas cepas obtenidas a partir de los consorcios. Los ensayos de crecimiento a partir de intermediaros de la vía de la atrazina nos permitieron concluir que como mínimo el consorcio tiene que estar compuesto por *Arthrobacter* sp. que tiene un rol importante en los tres primeros pasos de la vía de degradación y por *Ochrobactrum* sp. o *Xanthobacter* sp. que mostraron tener la misma eficiencia en degradar el intermediario ácido cianúrico, lo que permitiría llegar hasta los últimos pasos de la vía.

También se detectó los genes *trzN-atzBC-trzD* y *trzN-atzBC* en los nuevos enriquecimientos obtenidos de Aguas Corrientes y Dolores, por lo que estas enzimas estarían ampliamente distribuidas en ecosistemas aunque no estuvieron expuestos a una fuerte presión de selección por el herbicida.

[71]

Los genes de la vía de degradación de la atrazina pueden perderse fácilmente si no se mantiene una presión de selección fuerte en el medio de cultivo.

El nitrato y la atrazina pueden ser consumidos por el consorcio SAC25 simultáneamente sin que existan modificaciones en la velocidad de degradación de atrazina ni en la capacidad de degradar el intermediario ácido cianúrico. Esto sería una ventaja, ya que seguramente en un ambiente natural exista al mismo tiempo más de una fuente de N disponible.

La presencia de nitrato produjo cambios en la composición del consorcio SAC25. Los miembros de los grupos *Beta* y *Gamaproteobacteria* aumentaron su proporción relativa en estas condiciones, mientras que los miembros de las *Alfaproteobacterias* disminuyeron su proporción. La diversidad de especies que compone el consorcio SAC25 podría haber asegurado la estabilidad de la función degradadora de atrazina.

La incubación a una temperatura menor (20°C) no afectó la composición de SAC25 ni la velocidad de degradación de atrazina. El consorcio SAC25 también fue estable y eficiente en degradar nitrato y atrazina a 20°C. Esto lo podría convertir en una buena alternativa como herramienta de biorremediación en ambientes contaminados con atrazina.
## 7. Referencias bibliográficas

- Abate G, Masini JC (2005) Sorption of atrazine, propazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine and hydroxyatrazine onto organovermiculite. J Braz Chem Soc 16:936-943
- Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V, Poltz MF (2005) PCR-induced sequences artifacts and bias insights from comparison of two *16SrARN* clone libraries constructed from the same sample. Appl Environ Microbiol 71:8966-8969
- Aislabie J, Bej AK, Ryburn J, Lloyd N, Wilkins A (2005) Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil New Zealand. FEMS Microbiol Ecol 52:279-286
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-410
- Anderson KL, Wheeler KA, Robisnson JB, Tuovinen OH (2002) Atrazine mineralization potential in two wetlands. Water Res 36:4785-4794
- Atlas RM y Bartha R (2001). En Microbial ecology: Fundamentals and applications. United States: Benjamin-Cummings Pub. Co., Menlo Park, CA.
- Baranda B, Barranco A, Martínez de Marañón I (2011) Fast atrazine photodegradation in water by pulsed light technology. Water Res 46:669-678
- Behki R, Topp E, Dick W, Germon P (1993) Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strain. Appl Environ Microbiol 59:1955-1959
- Bellini MI, Pinelli L., Dos Santos ME, Fernandez A (2014) Bacterial consortia from raw water and sludges from water potabilization plants are able to degrade atrazine. Int Biodeter Biodergad 90:131-139
- Benner J, Helbling DE, Kohler HPE, Wittebol J, Kaiser E, Prasse C, Ternes TA, Albers CN, Aamand J, Horemans B, Springael D, Walravens E, Boon N (2013) Is biological treatment a viable

alternative for micropollutant removal in drinking water treatment processes? Water Res 47:5955-5976

- Bhardwaj P, Sharma A, Sagarkar S, Kapleya A (2015) Mapping atrazine and phenol degradation genes in *Pseudomonas* sp. EGD-AKN5. Biochem Eng J 102:125-134
- Bichart F, Sims GK, Mulvaney RL (1999). Microbial utilization of heterocyclic nitrogen from atrazine. Soil Sci Soc Am J 63:100-110
- Biradar DP, Rayburn AL (1995) Chromosomal damage induced by herbicide contamination at concentrations observed in public water supplies. J Environ Qual 24:1222-1225
- Cai B, Han Y, Liu B, Ren Y, Jiang S (2003) Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China. Lett Appl Microbiol 36:272-276
- Cameron SM, Durchschein K, Richman JE, Sadowsky MJ, Wackett LP (2011) A New Family of Biuret Hydrolases Involved in S-Triazine Ring Metabolism. ACS Catal 1:1075-1082
- Cespedes-Payret C, Pineiro G, Achkar M, Gutierrez O, Panario D (2009) The irruption of new agroindustrial technologies in Uruguay and their environmental impacts on soil, water supply and biodiversity: a review. Int J Environ Health 3:175-197
- Changey F, Devers M, Rouard N, Martin-Laurent F (2011) *In vitro* evolution of an atrazine-degrading population under cyanuric acid selection pressure: evidence for the selective loss of a 47 kb region on the plasmid ADP1 containing the *atzA*, *B* and *C* genes. Gene 490:18-25
- Cheng G, Shapir N, Sadowsky MJ, Wackett LP (2005) Allophanate hydrolase, not urease, functions in bacterial cyanuric acid metabolism. Appl Environ Microbiol 71:4437-4445
- Chirnside A, Ritter W, Radosevich M (2007) Isolation of a selected microbial consortium from a pesticide-contaminated mix-load site soil capable of degrading the herbicides atrazine and alachlor. Soil Biol Biochem 39:3065-3065
- Comisión de la Unión Europea (2004) Decisión de la comisión relativa a la no inclusión de la atrazina en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE del Consejo y a la retirada de las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan esta sustancia activa. Diario Oficial de la Unión Europea 78:53-55
- Da Cunha J, Pinelli L, Bellini MI, Davyt D, Fernandez-Scavino A (2013) Determinación de atrazina e intermediarios de biodegradación en enriquecimientos bacterianos provenientes de cursos de agua superficial de Uruguay. INNOTEC 8:23-29

- de Souza ML, Newcombe D, Alvey S, Crowley DE, Hay A, Sadowsky MJ, Wackett LP (1998a) Molecular basis of bacterial consortium: interspecies catabolism of atrazine. Appl Environ Microbiol 64:178-184
- de Souza ML, Seffernick J, Martinez B, Sadowsky MJ, Wackett LP (1998b) The atrazine catabolism genes atzABC are widespread and highly conserved. J Bacteriol 180:1951-1954
- Devers M, Azhari NE, Kolic NU, Martin-Laurent F (2007a) Detection and organization of atrazinedegrading genetic potential of seventeen bacterial isolates belonging to divergent taxa indicate a recent common origin of their catabolic functions. FEMS Microbiol Ecol 273:78-86
- Devers M, Rouard N, Martin-Laurent F (2007b) Genetic rearrangement of the *atzAB* atrazine-degrading gene cassette from pADP1::Tn5 to the chromosome of *Variovorax* sp. MD1 and MD2. Gene 392:1-6
- Devers M, Rouard N, Martin-Laurent F (2008) Fitness drift of an atrazine-degrading population under atrazine selection pressure. Environ Microbiol 10:676-684
- Douglass J, Radosevichb M, Tuovinen O (2015) Molecular analysis of atrazine-degrading bacteria and catabolic genes in the water column and sediment of a created wetland in an agricultural-urban watershed. Ecol Eng 83: 405-412
- El Sebai T, Devers M; Changey F, Rouard N, Martin-Laurent F (2011) Evidence of atrazine mineralization in a soil from the Nile Delta: Isolation of *Arthrobacter* sp. TES6, an atrazine-degrading strain. Int Biodeterior Biodegrad 65:1249-1255
- El País digital (2010, 4 de febrero) [Internet] Crece el nivel de herbicida en cuenca de Santa Lucía. Desde internet: http://historico.elpais.com.uy/10/02/09/pciuda\_470256.asp [con acceso el 21/11/2015]
- Fang H, Lian J, Wang H, Cai L, Yu Y (2015) Exploring bacterial community structure and function associated with atrazine biodegradation in repeatedly treated soils. J Hazard Mater 286:457-465
- Fazlurrahman BM, Pandey J, Suri CR, Jain RK (2009) Isolation and characterization of an atrazinedegrading *Rhodococcus* sp., strain MB-P1 from contaminated soil. Lett Appl Microbiol 49:721-29
- Feaking S, Blackburn E, Burns RG (1994) Biodegradation of s-triazine herbicides at low concentration in surface waters. Water Res 28:2289-2296

- Fruchey I, Shapir N, Sadowsky MJ, Wackett LP (2003) On the origins of cyanuric acid hydrolase: Purification, substrates, and prevalence of AtzD from *Pseudomonas* sp. strain ADP. Appl Environ Microbiol 69:3653-3657
- García-González V, Govantes F, Shaw LJ, Burns RG, Santero E (2003) Nitrogen control of atrazine utilization in *Pseudomonas* sp. strain ADP. Appl Environ Microbiol 69:6987-6993
- Ghosh D, Roy K, White DC, Mueller T, Tuovinen O, Sublette K, Peacock A, Radosevich M (2009). *In situ* enrichment and analysis of atrazine-degrading microbial communities using atrazinecontaining porous beads. Soil Biol Biochem 41:1331-1334
- Ghosh D, Roy K, Williamson KE, White DC, Wommack KE, Sublette KL, Radosevich M (2007) Prevalence of lysogeny among soil bacteria and prevalence of *16SrRNA* and *trzN* genes in viralcommunity DNA. Appl Environ Microbiol 74:495-502
- Giardi MT, Giardina MC, Filacchioni G (1985) Chemical and biological degradation of primary metabolites of atrazine by a Nocardia strain. Agric Biol Chem 49:1551-1558
- Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA, Vonk A (2002) Hermaphroditic demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. Proc Natl Acad Sci USA 99: 5476-5480
- Hernandez M, Morgante V, Avila M, Villalobos P, Miralles P, Gonzalez M (2008) Novel s-triazinedegrading bacteria isolated from agricultural soils of central Chile for herbicide bioremediation Electron J Biotechnol 11:1-7
- Hrsak D, Havriluk M (2010) Mixed bacterial culture for atrazine degradation. United States Rudjer Boskovic Institute (Zagreb) Patent N° 7658850 Desde internet: <http://www.freepatentsonline.com/7658850.html> [con acceso el 21/11/2015]
- Jurina T, Terzic S, Ahel M, Stipicevic S, Kontrec D, Kurtanjek Z, Kolic NU (2014) Catabolism of terbuthylazine by mixed bacterial culture originating from s-triazine-contaminated soil. Appl Microbiol Biotechnol 98:7223-7232
- Karns JS (1999) Gene sequence and properties of an s-triazine ring cleavage enzyme from *Pseudomonas* sp. strain NRRLB-12227. Appl Environ Microbiol 65:3512–3517
- Karns JS, Eaton RW (1997) Genes encoding s-triazine degradation are plasmid-borne in *Klebsiella* pneumonia strain 99. J Agric Food Chem 45:1017-1022
- Kaufman DD, Blake J (1970) Degradation of atrazine by soil fungi. Soil Biol Biochem 2:73-80
- Kolic NU, Hrsak D, Mendas G, Filipeie D (2003) Enrichment and characterization of atrazine-degrading bacterial communities. Food Technol Biotech 41:211-217

- Kolic NU, Hrsak D, Kolar AB, Petric I, Stipicevic S, Soulas G, Martin-Laurent F (2007) Combined metabolic activity within an atrazine-mineralizing community enriched from agrochemical factory soil. Int Biodeterior Biodegrad 60:299-307
- Kolic NU, Martin-Laurent F, Devers M, Petric I, Kolar B, Hrsak D (2008) Genetic potential, diversity and activity of an atrazine-degrading community enriched from an herbicide factory effluent. J Appl Microbiol 105:1334-1343
- Kolic NU, Hrsak D, Devers M, Klepac Ceraj V, Petric I, Martin-Laurent F (2010) Taxonomic and functional diversity of atrazine-degrading bacterial communities enriched from agrochemical factory soil. J Appl Microbiol 109:355-367
- Kolic NU, Devers ML, Petric I, Hrsak D, Martin-Laurent F (2011) Evidence for taxonomic and functional drift of an atrazine-degrading culture in response to high atrazine input. Appl Microbiol Biotechnol 90:1547–1554
- Kolic NU, Scott C, Martin-Laurent F (2012) Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment. Appl Microbiol Biotechnol 96:1175-1189
- Kolpin DW, Thurman EM, Linhart SM (1998) The environmental occurrence of herbicides: The importance of degradates in ground water. Arch Environ Contam Toxicol 35: 385-390
- Koskinen WC, Clay SA (1997) Factors affecting atrazine fate in North Central US soils. Reviews Environ Contam Toxicol 151:117-165
- Krutz LJ, Shaner DL, Weaver MA, Webb RMT, Zablotowicz RM, Re KN, Huang Y, Thomson SJ (2010) Agronomic and environmental implications of enhanced s-triazine degradation. Pest Mnag Sci 66:461-481
- La diaria (2014, 7 de noviembre) [Internet] Sorgo dulce: hallaron rastros de atrazina en Laguna del Cisne. Desde internet: <a href="http://ladiaria.com.uy/articulo/2014/11/sorgo-amargo/">http://ladiaria.com.uy/articulo/2014/11/sorgo-amargo/</a>> [con acceso el 21/11/2015]
- Laird DA, Koskinen WC (2008) Triazine soil interaction In: The triazine herbicides-50 years revolutionizing agriculture. LeBaron HM, McFarland JE, Burnside OC (ed) San Diego United States 21:275:299
- Madsen EL (2008) Evolution of catabolic pathways for organic contaminants. In: Environ Microbiol from genomes to biogeochemistry. Madsen EL (ed) 403-409
- Mandelbaum RT, Wackett LP, Allan DL (1993) Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. Appl Environ Microb 59:1695-1701
- Mandelbaum RT, Allan DL, Wackett LP (1995) Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. Appl Environ Microbiol 61:1451-1457

- Mandelbaum RT, Wackett LP (1996) *Pseudomonas* strain for degradation of s-triazines in soil and water. United States Regents of the University of Minnesota Patent N°5508193 Desde internet <http://www.freepatentsonline.com/5508193.html> [con acceso el 21/11/2015]
- Martínez B, Tomkins J, Wackett LP, Wing R, Sadowsky MJ (2001) Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. J Bacteriol 183:5684-5697
- Martin-Laurent F, Barres B, Wagschal I, Piutti S, Devers M, Soulas G, Philippot L (2006) Impact of the maize rhizosphere on the genetic structure, the diversity and the atrazine-degrading gene composition of cultivable atrazine-degrading communities. Plant Soil 282:99-115
- Masaphy S, Levanon D, Vaya J, Henis Y (1993) Isolation and characterization of a novel atrazine metabolite produced by the fungus *Pleurotus pulmonarius*, 2-chloro-4-ethylamino-6-(1hydroxyisopropyl)amino-1,3,5-triazine. Appl Environ Microbiol 59:4342-4346
- McDonald IR, Kampfer P, Topp E, Warner KL, Cox MJ, Connell Hancock TL, Miller LG, Larkin MJ, Ducrocq V, Coulter C, Harper DB, Murrell C, Oremland RS (2005) *Aminobacter ciceronei* sp. nov. and *Aminobacter lissarensis* sp. nov., isolated from various terrestrial environments. Int J Syst Evol Microbiol 55:1827-1832
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) (2015) [Internet] Resumen importaciones productos fitosanitarios 2010 al 2014. <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,dgsa,dgsa-servicios-datos-estadisticos-deimportaciones,O,es,0> [con acceso el 21/11/2015]
- Mougin C, Laugero C, Asther M, Dubroca J, Frasse P, Asther M (1994) Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl Environ Microbiol 60:705-708
- Mudhoo A, Garg VK (2011) Sorption, transport and transformation of atrazine in soils, minerals and composts: a review. Pedosphere 21:11-25
- Nagy I, Compernolle F, Ghys K, Vanderleyden J, Demot R (1995) A single cytochrome P-450 system is involved in degradation of the herbicides EPTC (s-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21. Appl Environ Microbiol 61:2056-2060
- Newcombe DA, Crowley DE (1999) Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria. Appl Microbiol Biotechnol 51: 877-882
- Nigigi A, Getenga ZM, Boga HI, Ndalut PK (2013) Biodegradation of s-triazine herbicide atrazine by *Enterobacter cloacae* and *Burkholderia cepacia* sp. from long-term treated sugarcanecultivated soils in Kenya. J Environ Sci Health 47:769:778

- Niu S, Guo Q, Cai B (2013) Method for recovering herbicide atrazine-polluted soil by using degradable bacteria. Nankay University China Application Patent N° 201210396660
- Nwachukwv EO, Osuji JO (2007) Bioremedial degradation of some herbicides by indigenous white rot fungus, *Lentinus subnudus*. J Plant Sci 2:619-624
- Peterson DE, Thomson CR, Regehr DL, Al-Khatib K (2001) Herbicide Mode of Action. Kansas State University C715:24 Disponible desde internet en <http://www.bookstore.ksre.ksu.edu/pubs/c715.pdf> [con acceso el 21/11/2015]
- Piutti S, Semon E, Landry D, Hartmann A, Dousset S, Lichtfouse E, Topp E, Soulas G, Martin-Laurent F (2003) Isolation and characterisation of *Nocardioides* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene trzN from bulk and maize rhizosphere soil. FEMS Microbiol Lett 221: 111-117
- Porto ML, Alfonso A, Bonari G, Iriburo A, Castagnino G, Caristo R (2011) Atrazine analysis for the evaluation of drinking water: treatment with a jar test [Poster]. 3rd Latin American Pesticide Residue Workshop Uruguay Book of abstracts 1:121
- Radosevich M, Tuovinen OH, Traina SJ (1995a) s-Triazine degrading bacteria. United States Ohio State Research Foundation (Columbus, OH) Patent N° 542994 Desde internet: <a href="http://www.freepatentsonline.com/5429949.html">http://www.freepatentsonline.com/5429949.html</a>
- Radosevich MS, Traina SJ, Hao Y, Touvinen OH (1995b) Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. Appl Environ Microbiol 61:297-302
- Rhine ED, Fuhrmann JJ, Radosevich M (2003) Microbial community responses to atrazine exposure and nutrient availability: linking degradation capacity to community structure. FEMS Microbiol Ecol 46:145-160
- Rousseaux S, Hartmann A, Soulas G (2001) Isolation and characterization of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. FEMS Microbiol Ecol 36:211-222
- Rousseaux S, Soulas G, Hartmann A (2002) Plasmid localization of atrazine-degrading genes in newly described *Chelatobacter* and *Arthrobacter* strains. FEMS Microbiol Ecol 41:69-75
- Sadowsky MJ, Tong ZK, de Souza M, Wackett LP (1998) AtzC is a new member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. J Bacteriol 180:152–158

- Sajjaphan K, Heepngoen P, Sadowsky MJ, Boonkerd N (2010) *Arthrobacter* sp. strain KU001 isolated from a Thai soil degrades atrazine in the presence of inorganic nitrogen sources. J Microbiol Biotechnol 20: 602-608
- Sajjaphan K, Shapir N, Wackett LP, Palmer M, Blackmon B, Tomkins J, Sadowsky MJ (2004) Arthrobacter aurescens TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB* and *atzC* are linked on a 160 kilobase region and are functional in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 70:4402-4407
- Satsuma K (2009). Complete biodegradation of atrazine by a microbial community isolated from a naturally derived river ecosystem (microcosm). Chemosphere 77:590-596
- Satsuma K, Kameshiro M, Hayashi O, Sato K, Kato Y (2006) Characterization of a Nocardioides based, atrazine-mineralizing microbial colony isolated from Japanese riverbed sediment. Note J Pest Sci 31:420-423
- Schütte UME, Abdo Z, Bent SJ, Shyu C, Williams CJ, Pierson JD, Forney LJ (2008) Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. Appl Microbiol Biotechnol 80:365–380
- Schwab AP, Splichal PA, Banks MK (2005) Persistence of atrazine and alachlor in ground water aquifers and soil. Water Air Soil Pollut 171:203-235
- Seffernick J, Aleem A, Osborne JP, Johnson G, Sadowsky MJ, Wackett LP (2007) Hydroxyatrazine N-Ethylaminohydrolase (AtzB): an amidohydrolase Ssperfamily enzyme catalyzing deamination and dechlorination. J Bacteriol 189:6989-6997
- Shapir N, Rosendahl C, Johnson G, Andreina M, Sadowsky MJ, Wackett LP (2005). Substrate specificity and colorimetric assay for recombinant TrzN derived from *Arthrobacter aurescens* TC1. App. Environ Microbiol 71:2214-2220
- Shapir N, Pedersen C, Gil O, Strong L, Seffernick J, Sadowsky MJ, Wackett LP (2006a) TrzN from *Arthrobacter aurescens* TC1 is a zinc amidohydrolase. J Bacteriol 188:5859-5864
- Shapir N, Cheng G, Sadowsky MJ, Wackett LP (2006b) Purification and characterization of TrzF: biuret hydrolysis by allophanate hydrolase supports growth. Appl Environ Microbiol 72:2491-2495
- Shapir N, Mongodin EF, Sadowsky J, Daughetry SC, Nelson KE, Wackett L (2007) Evolution of catabolic pathway: genomic insights into microbial s-triazine metabolism. J Bacteriol 189.674-682
- Sherchan SP, Bachoon DS (2011) The presence of atrazine and atrazine-degrading bacteria in the residential, cattle farming, forested and golf course regions of Lake Oconee. J Appl Microbiol 111:293-299

- Siripattanakul S, Wirojanagud W, McEvoy J, Limpiyakorn T, Khan E (2009) Atrazine degradation by stable mixed cultures enriched from agricultural soil and their characterization. J Appl Microbiol 106:986-992
- Smith D, Alvey S, Crowley DE (2005) Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. FEMS Microbiol Ecol 53:265-273
- Solomon KR, Baker DB, Richards R, Dixon KR, Klaine SJ, La Point TW, Kendal RJ, Weisskopf CP, Giddings JM, Giesy JP, Hall Jr LW, Williams WM (1996) Annual review Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. Environ Toxicol Chem 15:31-74
- Stipicevic S, Galzina N, Kolic NU, Jurina T, Mendas G, Dvorscak M, Petric I, Baric K, Drevenkar V (2015) Distribution of terbuthylazine and atrazine residues in crop-cultivated soil: The effect of herbicide application rate on herbicide persistence. Geoderma 259–260:300-309
- Strong, LC, Rosendahl C, Johnson G, Sadowsky MJ, Wackett LP (2002) *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. Appl Environ Microbiol 68:5973-5980
- Struthers JK, Jayachandran K, Moorman TB (1998) Biodegradation of atrazine *by Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. Appl Environ Microbiol 64:3368-3375
- Swissa N, Nitzan Y, Langzam Y, Cahan R (2014) Atrazine biodegradation by a monoculture of *Raoultella planticola* isolated from a herbicides wastewater treatment facility. Int Biodeterior Biodegrad 92:6-11
- Tavera-Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, Fournier M, Cyr D, Marcogliese D (2002) Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the ovary. Environ Toxicol Chem 21:1264-1267
- Topp E, Zhu H, Nour SM, Houot S, Lewis M, Cuppels D (2000) Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils. Appl Environ Microbiol 66:2773-2782
- United State Environmental Protection Agency Atrazine (US EPA) (1994) [Internet] Atrazine, simazine and cyanazine; notice of initiation of special review. Fed Reg 59:60412–60443 disponible desde internet en: <a href="http://www.gpo.gov/fdsys/granule/FR-1994-11-23/94-28553">http://www.gpo.gov/fdsys/granule/FR-1994-11-23/94-28553</a>> [con acceso el 21/11/2015]
- United States Environmental Protection Agency (US EPA) (1997) [Internet] US Pesticides industry sales and usage: 1994 and 1995 market estimates. Report 2:19 Disponible desde internet en: <a href="http://www.nchh.org/Portals/0/Contents/Article0291.pdf">http://www.nchh.org/Portals/0/Contents/Article0291.pdf</a>> [con acceso el 21/11/2015]

- United State Environmental Protection Agency (US EPA) (2011) [Internet] US Pesticides industry sales and usage: 2006 and 2007 market estimates. Report 1:33 Disponible desde internet en: <http://www2.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/market estimates2007.pdf> [con acceso el 21/11/2015]
- Vaishampayan PA, Kanekar PP, Dhakephalkar PK (2007) Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil. Int Biodet Biodegrad 60:273-278
- Vibber LL, Pressler MJ (2007) Isolation and characterization of novel atrazine degrading microorganisms from an agricultural soil. Appl Environ Microbiol 75:921-928
- Wagner M, Loy A, Nogueira R, Purkhold U, Lee N, Daims H (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. Antonie van Leeuwenhoek 81:665-680
- Wang J, Zhu LS, Liu AJ, Ma T, Wang Q, Xie H, Wang J, Jiang T, Zhao R (2011) Isolation and characterization of an *Arthrobacter* sp. strain HB-5 that transforms atrazine. Environ Geochem Health 33:259-266
- Wang J, Zhu LS, Wang Q, Wang J, Xie H (2014) Isolation and characterization of atrazine mineralizing Bacillus subtilis strain HB-6. PLoS ONE 9:e107270
- Wang QF, Xie SG (2012) Isolation and characterization of a high efficiency soil atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strain. Int Biodeterior Biodegrad 71:61-66
- World Health Organization (WHO) (2009) The WHO recommended classification of pesticide by hazard. Guidelines to clasification IPCS
- Yang C, Li Y, Zhang K, Wang X, Ma C, Tang H & Xu P (2010) Atrazine degradation by a simple consortium of *Klebsiella* sp. A1 and *Comamonas* sp. A2 in nitrogen enriched medium. Biodegrad 21:97-105
- Yanze-Kontchou C, Gschwin N (1994) Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. Appl Environ Microbiol 60:4297-4302
- Zhang Y, Jiang Z, Cao B, Hu M, Wang ZG, Dong XN (2011) Metabolic ability and gene characteristics of *Arthrobacter* sp. strain DNS10, the sole atrazine degrading strain in a consortium isolated from black soil. Int Biodeterior Biodegrad 65:1140-1144
- Zhang Y, Cao B, Jiang Z, Dong X, Hu M, Wang Z (2012) Metabolic ability and individual characteristics of an atrazine-degrading consortium DNC5. J Has Mat 237-238:376-381

MM	1a	2a	3a	4a		5a	6a	7a	8a	9a	MM	MN	1 10a	11a	12a	13a	14a	15a	16a	17a	18a	MM
19a	20a	21a	5a	22a	23a	24a	25a	1b	MM	M	M 26	a 27a	28a	29a !	5a 3	0a 3	1a 3	32a	33a	MM		
				-		-	-		1			10	1		-		-		1	1		
111	-	11		1	-	= 1	-	1-1-1	III	1111	1111	11	-				1 1					
-	-	-	-	i	=	1	i				-	1										
-	-	-		-	-	=	100			* * *	1.1.1				1							
MM	34a	35a	36a	37a	38a	5a	40a	MN														
1111		1		1 1 1 1		1 第 第 1	111	1111														
1 2 3	「「「	「「「「「」」					1	L'I I														
MM	39a	2b	3b	4b	5a	5b	6b	7b	8b	9b	MM	MM	105	116 1	2b 1	3b 1	4b 5	5a	15b	16b	17b	186 MI
III											-	-			-				-			- 1
111	-	11			1 1	1 1	-		-	-	-	1111		-		1 1	1 11	1 11	-	1 1	111	1 1
-	-		=	11 11	-		-	-			-	-	-			11	- 14	11	-	111	-	1 1
	-	-	-				-	-	-													-

Anexo I. Análisis de ARDRA de las bibliotecas del gen ARNr16S de los consorcios SAC1 y SAC25.



**Figura AI.1.** Electroforesis de los fragmentos de digestión obtenidos con las enzimas *Hha*l y *Msp*l del segmento T3/T7 de los clones de SAC1 (a) y SAC25 (b). MM indica el marcador de peso molecular V (Roche).