



7^{mo}
Congreso de
Medio Ambiente

Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM
22 al 24 de mayo de 2012. UNLP. La Plata Argentina

**SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIOS DE
BACTERIAS COMO HERRAMIENTA DE BIORREMEDIACIÓN
DE LA CONTAMINACIÓN POR ATRAZINA EN PLANTAS
POTABILIZADORAS DE AGUA.**

**Selection and characterization of bacterial consortium as a tool for bioremediation
of atrazine contamination in water treatment plants.**

Laura Pinelli^{ab*}, Jonathan Da Cunha^a, María Inés Bellini^a, Ana Fernández Scavino^a

^a Laboratorio de Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental, Departamento de Biociencias (DEPBIO), Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Avenida General Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay.

^b Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR), Iguá 5225, 11400 Montevideo, Uruguay.

* Autor para correspondencia: lpinelli@gmail.com

Palabras clave: consorcios de bacterias, plantas potabilizadoras de agua, biorremediación, genes metabólicos de atrazina.

Keywords: bacterial consortium, water treatment plants, bioremediation, atrazine metabolic genes.

Título abreviado: Consorcios de bacterias degradadores de atrazina

ABSTRACT

The worldwide use, persistence, and toxicity of the herbicide atrazine and its metabolites have led to them becoming a common contaminant in surface and ground water at levels that sometimes exceed the maximum allowed by the US-EPA of 3 ppb. Although atrazine can be degraded abiotically, the biological is the most important at neutral pH and is the unique way that could degrade atrazine completely to NH_4 and CO_2 . Atrazine biodegradation has previously been shown to be carried out by several individual bacterial species such as *Pseudomonas* sp. strain ADP or by relatively simple bacterial consortia that have been enriched from large history contaminated soils. This study was focused on obtaining stable microbial consortium capable of degrade atrazine taken from incoming water of different potabilization treatment plants from Uruguay (Aguas Corrientes, Dolores y Florida) that have sporadically been exposure to low pulses of atrazine. We prepared microcosms assays with atrazine at a concentration of 20 ppm with or without other inorganic nitrogen amendment (NO_3^-) and two different incubation temperatures (20 °C and 30 °C). Stability of the bacterial consortium was tested by successive enrichment in an atrazine minimal medium (MDA) maintaining the same previous conditions. In all cases, atrazine degradation was monitored by UV-HPLC. In addition, atrazine metabolic genes *atzA*, *trzN*, *atzB*, *atzC*, *atzD* and *trzD* were amplified by PCR to confirm genetic stability. Four of the twelve microcosms assays showed atrazine degradation in a period of 11 days at different incubation conditions from samples from Dolores and Aguas Corrientes. Florida did not show atrazine degradation activity.

RESUMEN

El uso expandido a nivel mundial, la persistencia y toxicidad del herbicida atrazina y sus metabolitos llevaron a que se conviertan en uno de los contaminantes más comunes en aguas superficiales y subterráneas, excediendo en algunos casos los límites máximos permitidos por la EPA de 3 ppb. A pesar que la atrazina puede ser degradada abióticamente, la biológica es la vía de degradación más importante a pH neutro y es la única que podría terminar en CO_2 y NH_4 . La degradación biológica de la atrazina que puede llevarse a cabo por especies de bacterias aisladas como *Pseudomonas* sp. strain

ADP o por consorcios de bacterias relativamente sencillos que fueron obtenidos de suelos con una historia larga de contaminación. En este estudio, el foco se centró en obtener consorcios de bacterias capaces de degradar atrazina en muestras tomadas del agua que ingresa a diferentes plantas potabilizadoras (Aguas Corrientes, Dolores y Florida) que estuvieron esporádicamente expuestos a pulsos de atrazina en bajas concentraciones. Se realizaron ensayos en microcosmos con atrazina a una concentración de 20 ppm con o sin el agregado de otra fuente de nitrógeno (NO_3^-) y dos temperaturas de incubación diferentes (20°C y 30°C). La estabilidad de los consorcios se probó mediante repiques sucesivos en un medio mínimo (MDA) manteniendo las mismas condiciones previas. En todos los casos la degradación de atrazina se midió por UV-HPLC. Adicionalmente, se amplificaron por PCR los genes de la vía metabólica de degradación de la atrazina *atzA*, *trzN*, *atzB*, *atzC*, *atzD* and *trzD* para confirmar su presencia en los. Cuatro de doce tratamientos en el ensayo en microcosmos degradaron atrazina en un período de 11 días en Aguas Corrientes y Dolores. Las muestras de Florida no mostraron degradación de atrazina.

INTRODUCCIÓN

Desde su introducción en 1950, la atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) es uno de los herbicidas más ampliamente usados a nivel mundial (Koskinen & Clay 1997). En Uruguay, es el segundo herbicida importado en mayor cantidad luego del glifosato (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca [Internet, acceso 2012]). Es un herbicida de amplio espectro que se utiliza para controlar una gran variedad de malezas de hoja ancha y pastos anuales en cultivos de maíz, sorgo y caña de azúcar (Mudhoo & Garg, 2011). El uso extendido de la atrazina, su moderada persistencia y movilidad en suelos ocasionaron su detección en cursos de agua

superficial y subterránea en concentraciones que exceden los límites máximos permitidos por la US-EPA de 3 ppb (Smith *et al.*, 2005).

Si bien, la atrazina puede degradarse tanto por mecanismos abióticos como bióticos, el principal mecanismo de atenuación *in situ* a pH neutro es el llevado a cabo por comunidades de bacterias nativas. Gran variedad de bacterias fueron aisladas de suelos agrícolas o sitios muy contaminados con una historia larga de aplicación de atrazina, donde se esperaba que las comunidades de bacterias tuvieran una fuerte presión de selección para degradar el herbicida (Pearson *et al.*, 2006). Incluyen miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Nocardioides*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium* y *Ralstonia* entre otros (Yang *et al.*, 2010). En nuestro país no hay sitios con exposiciones prolongadas y altas a atrazina, como podrían ser las plantas químicas elaboradoras o envasadoras del herbicida. Además, en la literatura hay pocos reportes de intentos de aislamiento de bacterias a partir de sitios con historia corta o esporádica de aplicación de atrazina, tales como los cursos de agua superficiales que reciben el herbicida por un corto período de tiempo por escurrimiento desde las zonas donde es aplicado.

Se han descrito varias vías metabólicas bacterianas de degradación de la atrazina. Esta puede ser llevada a cabo en su totalidad por un único microorganismo o por consorcios de bacterias donde cada especie tiene sólo algunos genes y entre todas las especies se complementan para degradar atrazina parcial o totalmente (Smith *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2010). La vía metabólica mejor caracterizada incluye un primer paso de dechloración llevado a cabo por una clorohidrolasa codificada por el gen *atzA* o su homólogo *trzN*. Los dos pasos siguientes consisten en el desplazamiento de los grupos etilamino e

isopropilamino del anillo para dar ácido cianúrico y están codificados por los genes *atzB* y *atzC*. Para lograr la mineralización completa de la atrazina es necesario que estén presentes los genes *atzD*, o el homólogo *trzD* y los genes *atzE* y *atzF*, los cuales codifican para enzimas que rompen el anillo del ácido cianúrico mineralizándolo para dar NH_4^+ y CO_2 (Smith *et al.*, 2005; Devers *et al.*, 2007).

Este mecanismo que ocurre naturalmente podría ser utilizado como una herramienta de biorremediación frente a una eventual contaminación por atrazina en aguas que ingresan a una planta potabilizadora de agua. La factibilidad de aplicar un proceso de biorremediación depende de encontrar bacterias capaces de degradar rápidamente y con alta afinidad por la atrazina y sus intermediarios metabólicos, que dejen una concentración residual del herbicida por debajo de la tolerada y que mantengan su capacidad catabólica estable cuando se exponen a concentraciones intermitentes del herbicida.

El objetivo de este trabajo es obtener consorcios de bacterias degradadoras de atrazina a partir de muestras de agua en distintas plantas potabilizadoras del Uruguay mediante enriquecimientos sometidos a distintos factores de selección (temperatura y presencia de fuentes alternativas de nitrógeno). Adicionalmente, es pertinente evaluar la estabilidad de estos consorcios degradadores, su velocidad de degradación y la presencia de genes de la vía metabólica.

METODOLOGÍA

Área de estudio

Las muestras fueron tomadas en octubre de 2011 en tres plantas potabilizadoras de agua de OSE (Obras Sanitarias de Estado) ubicadas en la localidad de Aguas Corrientes (AC), ciudad de Dolores (D) y ciudad de Florida (F) en Uruguay (Figura 1). Los cursos de agua que abastecen a las plantas potabilizadoras de agua son: río Santa Lucía, río San Salvador y río Santa Lucía Chico, respectivamente. Los tres cursos de agua se encuentran en zonas de fuerte actividad agrícola y en ellos detectaron trazas de atrazina esporádicamente en algún momento previo a la toma de las muestras (OSE, com pers).



Figura 1. Mapa de Uruguay con las localidades de Aguas Corrientes, Dolores y Florida.

Figure 1. Map from Uruguay with de locations of Aguas Corrientes, Dolores and Florida.

Obtención y procesamiento de las muestras

Tanto para los análisis microbiológicos como fisicoquímicos se tomaron muestras del agua que ingresa a la planta (AB) en los tres sitios (AC, D y F). La muestra se tomó en un punto en el cual aún no ha sufrido ningún tipo de tratamiento dentro del proceso de potabilización. El AB se transportó en botellas de vidrio previamente esterilizadas, color ámbar de 4 litros, sin cámara de aire. Todas las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta llegar al laboratorio. Una vez en el laboratorio, las muestras se procesaron el mismo día para el ensayo en microcosmos. Los datos sobre pH, turbidez, alcalinidad y densidad fueron aportados por los funcionarios de cada planta. Se congelaron parte de las muestras para medir amonio, nitrato y DQO (demanda química de oxígeno).

Ensayo en microcosmos

Para determinar si las muestras obtenidas en los distintos sitios (AC, D y F) contenían microorganismos con capacidad degradadora de atrazina, se llevó a cabo un ensayo en microcosmos. Cada muestra se subdividió para ensayar cuatro tratamientos distintos. Los tratamientos consistieron en un medio mínimo que contenía atrazina comercial 90%: con o sin agregado de NO_3^- , incubando a 20°C o a 30°C (Tabla 1). Las bacterias presentes en las muestras de AB se concentraron 30 veces centrifugando en tubos Falcon estériles un volumen total de 2 litros a 6000 g durante 10 minutos. El pellet acumulado luego de sucesivas centrifugaciones se utilizó como inóculo resuspendiéndolo en 70 mL de la misma agua de donde procedía la muestra. Se sembró

con un 50% de inóculo, 70 mL de una solución estéril de buffer fosfato pH 7.2 contenida en frascos de vidrio (120 mL) con atrazina comercial disuelta para una concentración final de 20 ppm. Los frascos correspondientes al tratamiento con NO_3^- además de atrazina, contenían KNO_3 a una concentración final de 59 ppm. A su vez, se realizó un control estéril (esterilizado en autoclave a 121°C, 20 minutos) para cada muestra con el fin de verificar que la desaparición de atrazina era de origen biológico. Todos los tratamientos se suplementaron con una mezcla esterilizada de sustratos carbonados (metanol, succinato y acetato de sodio) en una proporción 10:1 C:N. Se incubó en atmósfera aerobia, en oscuridad, con agitación (vaivén a 150 rpm), a 20 ó a 30 °C según el tratamiento (Tabla 1). Se midió consumo de atrazina mediante la técnica de HPLC, como se describe más abajo, hasta que se verificó degradación o hasta un tiempo máximo de incubación de 88 días.

Tabla 1. Tratamientos realizados a cada una de las muestras tomadas en los distintos sitios (AC, D y F).

Table 1. Treatments carried out at each of the samples taken from different sites (AC, D and F)

Tratamiento	Atrazina comercial (ppm)	NO_3^- (ppm)	Temperatura de incubación (°C)
1	20	-	20
2	20	29	20
3	20	-	30
4	20	29	30
Control	20	29	30

Enriquecimientos sucesivos

En este ensayo se buscó seleccionar consorcios de microorganismos degradadores de atrazina que fueran estables, a partir de los microcosmos incubados en distintas condiciones que degradaban atrazina en un período inferior a los 11 días. Los repiques sucesivos se realizaron en tubos de vidrio (de 20 mL) con tapa rosca y septo de goma de butilo conteniendo 8 mL de medio de cultivo MDA estéril que contiene: K_2HPO_4 18 mM, KH_2PO_4 6 mM (pH 7.2), trazas minerales 5 mL/l (Touzel & Albagnac, 1983), acetato de sodio, ácido succínico y metanol en proporciones 10:1 C:N, solución de vitaminas 0.9X (Touzel & Albagnac, 1983), $CaCl_2$ 0.5 mM, $MgSO_4$ 1 mM, atrazina comercial 20 ppm como fuente de nitrógeno y sólo para los tratamientos con nitrato KNO_3 59 ppm. El inóculo fue del 5% y se tomó con jeringa estéril. Los repiques sucesivos se incubaron a 20°C o 30°C en oscuridad con agitación orbital hasta que mostraron degradación de atrazina o como máximo 1 semana. Una vez que se verificó degradación de atrazina se repicó nuevamente a medio MDA y se incubó en las mismas condiciones. Los casos en los que no se pudo verificar degradación se repicaron nuevamente desde algún repique anterior que hubiera degradado atrazina. La cantidad de veces que se repicó cada tratamiento fue variable. Se consideró que un sistema era estable cuando se pudo verificar el mismo porcentaje de degradación de atrazina y la misma turbidez (a 600 nm) luego de un tiempo de incubación similar en al menos tres repiques sucesivos.

Medidas analíticas

Determinación de atrazina

Se cuantificó usando la técnica de HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución). El sistema consistió en una bomba Waters 510, una columna C18 60 Å 4 µm, 3,9x300 mm (Waters Nova Pack, Inc.), un inyector manual de 20 µL y un detector UV/VIS (modelo SPT-10AV Shimadzu) a la longitud de onda de 222nm. El solvente de corrida fue acetonitrilo (40%) con buffer fosfato 0.05 M, pH 3 (60%). Se trabajó a un flujo de 1 mL/min y a temperatura ambiente. Los cromatogramas obtenidos se visualizaron y analizaron con el programa Peak 2 (Alan Heatherington). Previo a la inyección, se tomó 0.3 mL de medio de cultivo en condiciones estériles y se centrifugó a 11000 g durante 10 minutos. Las alícuotas que no se midieron en el momento de tomarlas se congelaron en viales de vidrio protegidos de la luz a -20°C. Se realizaron una curva de calibración con estándares de atrazina ppa (Sigma Aldrich). Cada punto de la curva se midió por triplicado. La ecuación de la recta calculadas mediante el método de mínimos cuadrados fueron $y = 296 x + 70$ ($R^2 = 0.9994$) para concentraciones entre 0.1 y 32 ppm. El tiempo de retención de atrazina en esas condiciones es 8,6 minutos.

Determinación de nitrato

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

Crecimiento de biomasa

El crecimiento de microorganismos se siguió midiendo la Densidad Óptica (DO) de la muestra a una longitud de onda de 600 nm. 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. Se realizó un blanco con el mismo medio que la muestra pero sin inocular con microorganismos.

Caracterización genética de los consorcios

- Extracción de ADN

Se extrajo el ADN total de algunos de los consorcios obtenidos en los enriquecimientos sucesivos. Se utilizó 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. Se tomó la biomasa obtenida luego de centrifugar entre 3.5 y 6 mL de cultivo con microorganismo. 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 una corrida electroforética en gel de agarosa 0.9% con tinción de bromuro de etidio.

- Detección de genes de la vía de degradación de atrazina

Se amplificaron, mediante la técnica de PCR, los genes metabólicos de la vía de degradación de la atrazina: *atzA*, *trzN*, *atzB*, *atzC*, *atzD* y *trzD* de los consorcios obtenidos en los repiques seleccionados. Los cebadores que se usaron se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores usados para amplificar los genes de la vía metabólica.

Table 2. Primers sequences used in the amplification of the genes involved in the atrazine degrading pathway.

Gen blanco	Nombre	Secuencia (5' → 3')	Referencia
atzA	atzAf	CCA TGT GAA CCA GAT CCT	de Souza <i>et al</i> (1998)
	atzAr	TGA AGC GTC CAC ATT ACC	de Souza <i>et al</i> (1998)
trzN	trzNf	CAC CAG CAC CTG TAC GAA GG	Mulbry <i>et al</i> (2002)
	trzNr	GAT TCG AAC CAT TCC AAA CG	Mulbry <i>et al</i> (2002)
atzB	2f	TCA CCG GGG ATG TCG CGG GC	de Souza <i>et al</i> (1998)
	2r	CTC TCC CGC ATG GCA TCG GG	de Souza <i>et al</i> (1998)
atzC	ATC1f	GCT CAC ATG CAG GTA CTC CCA	de Souza <i>et al</i> (1998)
	ATC2r	GTA CCA TAT CAC CGT TTG CCA	de Souza <i>et al</i> (1998)
atzD	392f	ACG CTC AGA TAA CGG AGA	Fruchey <i>et al</i> (2003)
	949r	TGT CGG AGT CAC TTA GCA	Fruchey <i>et al</i> (2003)
trzD	sf	ATC CGA TGT CCA CTT CGT TC	Smith <i>et al</i> (2005)
	sr	GAA TCG TCC AGC ATC GTG T	Smith <i>et al</i> (2005)

La reacción de amplificación se llevó a cabo en tubos eppendorf de 200 µL, en general, conteniendo 2,5 µL de ADN proveniente de la extracción, 2,5 µL de buffer 10X con (NH₄)₂SO₄ (Fermentas), 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM, Fermentas), 2 µL de dNTP (2.5 mM c/u), 1 µL de cada uno de los cebadores (25 µM), 0.25 µL de Taq Polimerasa (5 U/µL, Fermentas) y 14.2 µL de agua mQ. La reacción de PCR se corrió en un termociclador (Applied Biosystems) según las siguientes condiciones: un primer ciclo de 5 min a 95°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s a la temperatura de *annealing* correspondiente y 1 min a 72°C; un paso final de extensión de un ciclo de 7 min a 72°C. Las temperaturas

de annealing fueron 50 °C (*atzA*), 55 °C (*trzN* y *trzD*), 54 °C (*atzD*), 56 °C (*atzC*) o 63 °C (*atzB*). Como control positivo para los genes *atzA*, *B*, *C* y *D* se utilizó ADN extraído de la cepa *Pseudomonas* ADP y *Arthrobacter* sp. para los genes *trzN* y *trzD*. Ambas cepas fueron donas por Mark Radosevich.

Los distintos fragmentos generados en la amplificación fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa (Amaresco) al 1.5 % (p/v) diluído en buffer TBE 05X. En cada carril del gel se cargó 3 µL de muestra más 1 µL de buffer de corrida. Además se cargó un marcador de peso molecular 50bp (Fermentas). La corrida duró 30 minutos a 100 V. La presencia de bandas de ADN se visualizó incubando el gel en una solución de GelRed 5X durante 30 minutos. Los productos de PCR teñidos con GelRed se visualizaron con un transmisor UV/vis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo en microcosmos

Los ensayos en microcosmos inoculados con muestras provenientes de Dolores y Aguas Corrientes degradaron atrazina en todos los tratamientos realizados (excepto los dos tratamientos sin nitrato de Aguas Corrientes). La degradación se observó en la 1^{er} semana de incubación para algunas muestras y luego de la 12^a semana para otras

(Figura 2). Por el contrario, las muestras provenientes de Florida no mostraron degradación en ninguno de los tratamientos durante todo el período de incubación ensayado (13 semanas).

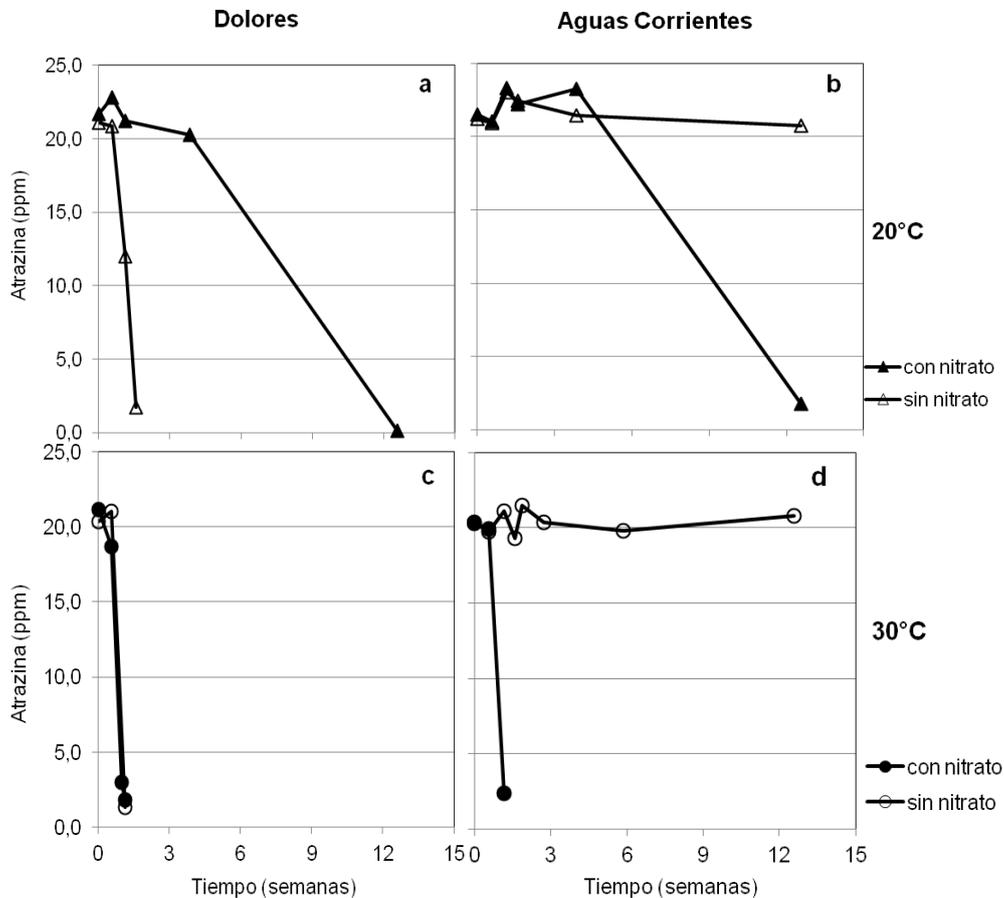


Figura 2. Degradación de atrazina en el ensayo en microcosmos inoculados con agua procedente de las plantas potabilizadoras de Dolores (a y c) y de Aguas Corrientes (b y d). Los controles estériles no degradaron atrazina en las 13 semanas de incubación (no se muestran los datos).

Figure 2. Atrazine degradation in microcosms assays inoculated with incoming water from treatment potabilization plants from Dolores (a and c) and Aguas Corrientes (b y d). Sterile controls did not degrade atrazine after 13 weeks incubation (data not shown).

Los resultados fueron dispares en cuanto a los tratamientos ensayados, si bien parecería ser más favorable la degradación de atrazina incubando en presencia de NO_3^- y a 30 °C, en algunos casos también hubo degradación incubando sólo en presencia de atrazina y a 20 °C (Dolores). La degradación en presencia de NO_3^- contrasta con trabajos anteriores en donde se verifica 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 mineralización completa ocurriría cuando la atrazina es utilizada como fuente de nitrógeno, ya que los átomos de carbono del ácido cianúrico están demasiado oxidados para ser utilizados como fuente de energía. La presencia de algún consorcio que pueda degradar atrazina en presencia de nitrato resulta interesante ya que normalmente en ambientes acuáticos hay presente otra fuente de nitrógeno y además el nitrato en un contaminante común de aguas.

Enriquecimientos sucesivos

A través de este ensayo se buscó obtener un consorcio de bacterias degradadoras de atrazina estable, tomando como partida los tratamientos que dieron mayor velocidad de degradación en el ensayo en microcosmos. Para ello se realizaron varios repiques sucesivos en medio MDA (con atrazina 20 ppm) manteniendo los mismos tratamientos que en el ensayo en microcosmos de donde provenía cada muestra (con o sin agregado de NO_3^- e incubando a 20°C o 30 °C). En este experimento podría esperarse que cada vez que se realice un repique nuevo, ocurra un evento de selección en donde se obtenga un nuevo consorcio de bacterias degradadoras de atrazina, hasta que la población

degradadora se purifica y se estabiliza. El consorcio estable obtenido, mantendría eventualmente durante todos los repiques, las mismas especies con los mismos genes actuando a la misma velocidad, lo cual traería como consecuencia que se mantenga estable la velocidad de degradación si se mantienen las mismas condiciones de cultivo.

Sin embargo, los resultados muestran que en los distintos tratamientos de las muestras de Dolores y Aguas Corrientes existe actividad degradadora de atrazina hasta un determinado número de repique sucesivo (Figuras 3a, 3b y 4). Una vez que se alcanza este número de repique el consorcio pierde o disminuye considerablemente la capacidad de degradar atrazina. Esto podría deberse a la plasticidad genética que presentan los genes metabólicos de la atrazina, ya que es sabido que muchos están codificados en plásmidos flaqueados por secuencias de inserción (IS), lo cual le confiere gran movilidad entre otros elementos genéticos (Martinez *et al.*, 2011). La finalización de la caracterización genética de los repiques dará mayor información para poder dilucidar cuáles podrían ser los genes que se pierden cuando el consorcio deja de degradar atrazina. El aislamiento de bacterias presentes en los consorcios y su caracterización metabólica y genética, así como el análisis de las comunidades presentes en esos consorcios podrían arrojar datos sobre las especies involucradas en la degradación y si hay alguno de estos integrantes que disminuye su proporción o se pierde a lo largo de los repiques.

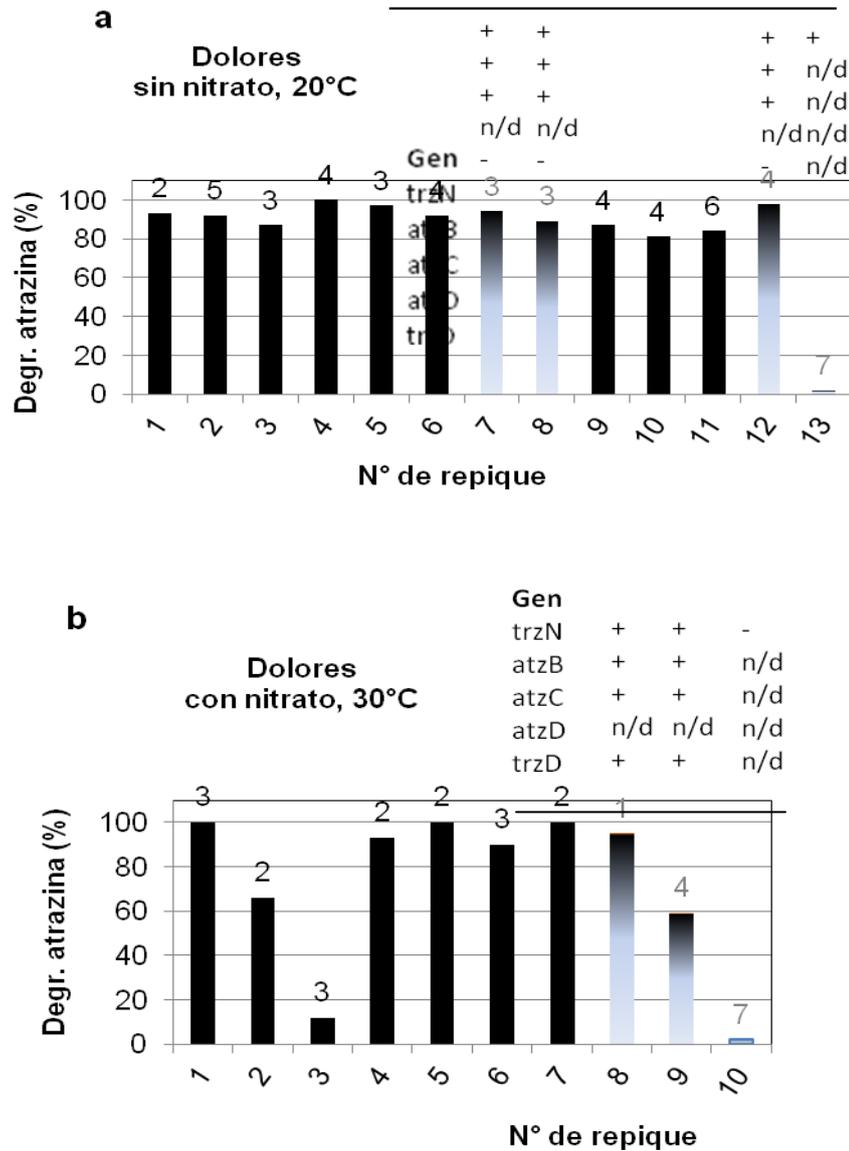


Figura 3. Degradación de atrazina (%) de los repiques sucesivos en las muestras de Dolores. Se realizaron para los tratamientos sin NO_3^- a 20 °C (a), con NO_3^- a 30 °C (b). Los tiempos de incubación (días) de cada repique se muestran sobre la barra. Las barras en degradé indican los repiques en los que se amplificaron los genes de la vía. En la tabla superior se muestra la detección por PCR de los genes de las vías metabólicas de degradación de atrazina para el correspondiente repique. Nota: n/d = no determinado.

Figure 3. Atrazine degradation (%) in successive subcultures from Dolores. Treatments analyzed where without NO_3^- at 20 °C (a) and with NO_3^- at 30 °C (b). Incubation time (days) are shown over graphic bars. Bars in grayscale indicate the subculture from which de functional genes were amplified. The table above shows the PCR amplifications of genes from the atrazine degradation pathway for each subculture.

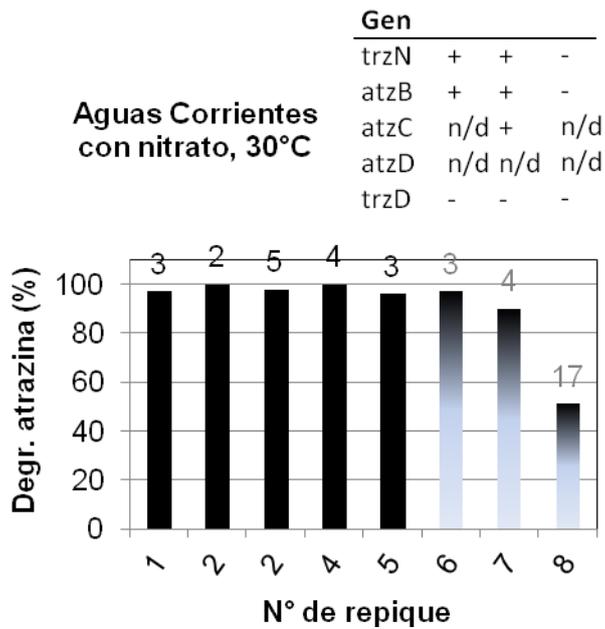


Figura 4. Degradación de atrazina (%) de los repiques sucesivos en las muestras de Aguas Corrientes. Se realizaron únicamente para el tratamiento con NO_3^- a 30 °C. Los tiempos de incubación de cada repique se muestran sobre cada barra. Las barras en degradé indican los repiques en los que se amplificaron los genes de la vía metabólica. En la tabla superior se muestran los genes que dieron o no producto de amplificación n/d = no determinado.

Figure 4. Atrazine degradation (%) in successive subcultures from Aguas Corrientes. Treatment analyzed was with NO_3^- at 30 °C. Incubation time (days) are shown over graphic bars. Bars in grayscale indicate the subculture from which de functional genes were amplified. The table above shows the PCR amplifications of genes from the atrazine degradation pathway for each subculture.

CONCLUSIONES

Existen bacterias con capacidad de degradar atrazina en cursos de agua que previamente no han estado expuestos al herbicida durante largos períodos de tiempo, por lo que, es probable que si el herbicida llega esporádicamente a estos sitios, pueda ser degradado por algunas especies nativas en un lapso de tiempo relativamente corto.

La degradación de atrazina puede ocurrir y conservarse en varios repiques aún en presencia de una fuente alternativa de nitrógeno como el nitrato.

Los consorcios de bacterias obtenidos luego de un cierto número de repiques sucesivos, pierden la capacidad de degradar atrazina, lo cual podría estar vinculado con la pérdida de algún gen de la vía, que es diferente según el origen de la muestra y las condiciones de incubación.

AGRADECIMIENTOS

Este Proyecto fue financiado por CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica) y se realizó en colaboración con OSE (Obras Sanitarias del Estado, Uruguay). Inés Bellini y Jonathan Da Cunha obtuvieron beca de ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- de Souza ML, Seffernick J, Martinez B, Sadowsky MJ & Wackett LP. 1998. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *Journal of Bacteriology*, 180: 1951-1954

- Devers M, Azhari NE, Kolic NU & Martin-Laurent F, 2007. Detection and organization of atrazine-degrading genetic potential of seventeen bacterial isolates belonging to divergent taxa indicate a recent common origin of their catabolic functions. *FEMS Microbial Ecology*, 273: 78-86

- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 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. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 6987-6993

- Koskinen WC & Clay SA. 1997. Factors affecting atrazine fate in North Central U.S. soils. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 151: 117-165

- 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. *Journal of Bacteriology*, 183: 5684-5697

- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), 2012 [Internet].

- Mudhoo A & Garg VK. 2011. Sorption, transport and transformation of atrazine in soils, minerals and composts: a review. *Pedosphere*, 21: 11-25

- Mulbry WW, Zhu H, Nour SM & Topp E. 2002. The triazine hydrolase gene *trzN* from *Nocardioides* sp. strain C190: Cloning and construction of gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*, 206: 75-79

- Pearson R, Godley A & Cartmell E. 2006. Investigating the *in situ* degradation of atrazine in groundwater. *Pest Management Science*, 62: 299-306

- Rhine ED, Fuhrmann JJ & Radosevich M. 2003. Microbial community responses to atrazine exposure and nutrient availability: linking degradation capacity to community structure. *FEMS Microbial Ecology*, 46: 145-160

- Smith D, Alvey S & Crowley DE. 2005. Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbial Ecology*, 53: 265-273

- Touzel JP & Albagnac G. 1983. Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiology Letters*, 16: 241–245

- 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. *Biodegradation*, 21: 97-105