

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA



**Rol de la bioaumentación con la bacteria *Pseudomonas* sp. MHP41 y
caracterización de las comunidades microbianas en la biorremediación de
herbicidas s-triazinas en suelos agrícolas contaminados**

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

VERONICA MAGALI MORGANTE



USM. BIBLIOTECA CENTRAL



3560900192480

Director de Tesis: Dr. Michael Seeger Pfeiffer

VALPARAISO
ENERO, 2009

COMISIÓN EVALUADORA

DR. ANDRES ILLANES F. (PUCV)



DR. JAMES ROBESON C. (PUCV)



DR. DAVOR COTORAS T. (UCH)



DRA. MARGARITA CARU M. (UCH)



DR. MICHAEL SEEGER P. (UTFSM)



*A vos mamá,
mi Ángel de la Guarda.*

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido una experiencia única, vital e intensa, en la que he compartido momentos y vivencias con un gran número de personas, que directa o indirectamente participaron del trabajo realizado. Por lo tanto, es mi deseo demostrarles a todos Uds. mi total gratitud hacia aquellas personas que han intervenido.

En primer lugar al Dr. Michael Seeger, director de esta Tesis, por haberme dado la oportunidad de realizarla, y por encima de todo, por haberme mostrado en cada momento una gran confianza en mí. Gracias querido Jefe!... por esas enormes "dosis" de humanidad en los momentos más difíciles, tanto del trabajo como de la vida. Gracias también a Alejandra, Alex y Sara Luna. También me gustaría resaltar su exigencia y rigor durante la fase experimental y la redacción del trabajo, enseñándome siempre a buscar la distinción. Gracias por transmitirme toda tu experiencia, espíritu científico y creatividad, que me han hecho disfrutar de la ciencia desde el primer día.

También, a todos los directivos y docentes miembros del Programa de Doctorado en Biotecnología (UTFSM-PUCV), quienes creyeron en mí y me dieron la oportunidad de estudiar en Chile. Por dedicarse a la difícil tarea de formar a jóvenes profesionales en el área de la investigación y aplicación científica... Gracias por confiar en mí! Gracias Sandra por tu buena voluntad de realizar las labores administrativas en este programa, que requieren de gran paciencia y dedicación.

Al Dr. Ramón Rosselló-Mora, del Institut Mediterrani d'Estudis Avançats (IMEDA) de la Universidad de las Islas Baleares (CSIC-UIB), España, por abrirme las puertas de su laboratorio e iniciarme en el mundo de las técnicas moleculares. A todo su grupo de trabajo (en especial a Arantxa, Ana Belén, Jocelyn, Francisco y Mercedes) quienes, durante mis dos estadias en Mallorca me transmitieron una gran dosis de formación, experiencia y rigor en mis experimentos de laboratorio.

Quisiera agradecer de forma especial, a la Dra. Mónica Vázquez, por su incuestionable ayuda y tenacidad en muchísimos momentos de esta Tesis. Me gustaría destacar, en especial, el tiempo dedicado y su colaboración durante el diseño experimental y el análisis de resultados que han sido de gran aporte. También quisiera agradecer su contención, comprensión y calidez en los aspectos no científicos.

También agradezco la colaboración de los investigadores Dr. Bernardo González y Dr. Edward Moore que apoyaron el desarrollo esta Tesis.

A todos los que forman parte del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la UTFSM, en especial a la Ing. Myriam González, por su permanente apoyo, paciencia y mirada rigurosa del manejo del laboratorio, que hacen día a día posible el trabajo en él. Por su tiempo dedicado, en los análisis de HPLC como así también, en la ayuda entregada en todos los aspectos técnicos y analíticos de esta Tesis. Respecto a mis compañeros del laboratorio, he tenido la suerte de conocer gente estupenda, con una gran ilusión por aprender, ayudar y vivir. El recuerdo de los años compartidos permanecerá siempre.

A Pola Miralles y Cecilia Flores, por mostrar siempre un gran interés e ilusión por aprender, por compartir muchas horas de laboratorio y siempre con buen ánimo. Por ayudarme también en multitud de ocasiones.

Agradezco la posibilidad que me dio el desarrollo de esta Tesis de haber conocido a: Victor Polanco, mi gran amigo en estos años, por protegerme en los momentos de mayor desesperación y ayudarme a crecer y madurar. A Marcela Carvajal, dispuesta siempre escuchar y a ayudar, desde el primer día que llegué a Valparaíso. A Marcela Hernández, por su espontaneidad y simpleza, por ser mi espejo y dejarme reflejar tal cual soy, por entendernos con solo mirarnos. Valeria Latorre, por enseñarme a reír todos los días de la vida y de mí misma. MayLin Almendras por integrarme a su familia y permitirme creer que el amor y la felicidad son posibles. También un especial recuerdo a Jorge Farías, Liza Laroze y Mauricio Díaz, compañeros del programa de Doctorado en Biotecnología.

Mi familia... quien me ha respaldado en todo momento, respetando mis propias decisiones e ilusión por la investigación. Muy especialmente agradezco el apoyo incondicional de papá Rubén y mis hermanos Carolina y Mauricio. Por entender que debí alejarme (solo físicamente) por este sueño de la Tesis... por estar "unidos" a mí a pesar de la distancia y porque para nosotros no hay nada más importante que el amor de nuestra familia. A mi sobrina Agustina... la princesita de la familia y mi cuñado Hernán. Mis adorados tíos Edgardo y Adriana y mis queridos primos Ceci y Gabi... por estar siempre presentes!!! Querida abuelita Chola, por cuidarme y protegerme... siempre. A vos, mamita, que lamentablemente y dolorosamente ya no estás conmigo, por ser mi guía y mi Ángel de la Guarda!

A vos Dani... por dejarme soñar e ilusionarme con un futuro a tu lado. Por devolverme la fe en el Amor!

Finalmente, a aquellas personas de fuera del ambiente científico, cuya ayuda ha sido sumamente importante. Para todos ellos, mi más sincera gratitud y mis mejores recuerdos.

RESUMEN

Los herbicidas s-triazinas como la simazina son ampliamente empleados para el control de malezas en zonas agrícolas y forestales. Son compuestos tóxicos de elevada persistencia en el ambiente y su detección en aguas superficiales y subterráneas es una problemática ambiental global. En Chile, cultivos de importancia económica son tratados con simazina. Los microorganismos de suelo desempeñan una función crucial, en la biodegradación de compuestos xenobióticos. La bioaumentación es una estrategia biotecnológica atractiva en la descontaminación de ambientes por ser una técnica de aplicación *in situ* y de menor costo e impacto ambiental. En esta tesis se postuló que la bioaumentación con la bacteria degradadora de s-triazinas *Pseudomonas* sp. MHP41 incrementa la degradación de simazina en suelos agrícolas contaminados y que las comunidades microbianas de los suelos agrícolas de la región de Valparaíso, experimentan cambios en su estructura en respuesta a la bioaumentación y exposición al herbicida simazina.

Los estudios se llevaron a cabo en dos tipos de suelo agrícola de la región de Valparaíso, que diferían principalmente en su textura, contenido de materia orgánica e historial de aplicación de simazina en suelo. Se determinaron los coeficientes de adsorción y valores de entalpía de adsorción de la simazina. Se estudió el efecto de la bioaumentación con la cepa MHP41 en microcosmos de suelo y a escala de campo. La cepa MHP41 se adicionó inmovilizada en alginato. La atenuación de simazina se cuantificó por HPLC y se estimó la actividad catabólica de degradadores de simazina (ACDS) mediante número más probable. Asimismo, el análisis de comunidades microbianas mediante técnicas moleculares cultivo-independiente (librerías de genes, T-RFLP y FISH) permitió caracterizar la diversidad nativa de los suelos y las variaciones en su estructura en respuesta a la bioaumentación.

Los resultados indicaron que la simazina se adsorbe moderadamente a los suelos estudiados principalmente por interacciones de la materia orgánica y la arcilla. Este proceso es reversible, y por lo tanto, la simazina está disponible para la biodegradación. En microcosmos de suelos sin historial de aplicación de simazina la bioaumentación incrementó la remoción de simazina y la ACDS respecto a los controles. En suelos con historial de aplicación de simazina se observó atenuación natural de simazina. Sin embargo, la inoculación con la cepa MHP41 redujo el tiempo de vida media del compuesto y aumentó la ACDS. La atenuación natural fue el principal mecanismo de remoción de simazina a escala de campo. Se demostró la gran diversidad bacteriana de los suelos agrícolas estudiados. Asimismo, se detectaron miembros activos del dominio *Archaea* en estos suelos. La bioaumentación con la cepa MHP41 promovió cambios en la estructura de las comunidades microbianas. Dichas variaciones se determinaron a nivel de la composición y la abundancia relativa de grupos filogenéticos específicos como *Alphaproteobacterias*, *Acidobacterias* y *Planctomycetes*.

La integración de técnicas de microbiología clásica y metodologías de biología molecular cultivo-independiente es fundamental para la comprensión del catabolismo de compuestos xenobióticos en ambientes complejos. El trabajo llevado a cabo en esta tesis contribuye al desarrollo de biotecnologías que integren criterios ambientales y a resolver la problemática que representa el manejo de residuos de herbicidas.

ABSTRACT

Simazine is an s-triazine herbicide widely used for the control of weeds and annual grasses in agriculture, forestry and non-crop lands. These compounds are toxic and persistent in the environment. Their detection in drinking and sub-surface water is increasing of environmental and health concern. In Chile, there are no restrictions for s-triazine usage in agriculture. Soil microbiota is involved in the degradation of these contaminants. Bioaugmentation is a promising and attractive biotechnology for clean-up of contaminated sites due to of their *in situ* application and low cost.

The hypothesis of this research postulated that bioaugmentation with the simazine-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. MHP41, increase the simazine attenuation in agricultural soil and, bioaugmentation and simazine amendments promote changes in the microbial community structure of agricultural soil.

For this study, two agricultural soils were selected from Valparaíso, central Chile. The main differences between both soils were the texture, the organic matter content and history of simazine application. Sorption coefficient and enthalpy values were determined to describe simazine retention and availability in agricultural soil. Microcosm and small field-scale experiment were performed to evaluate the capability of bioaugmentation strategies and the native soil microbiota for simazine removal. For soil bioaugmentation the strain MHP41 was added as an immobilized inoculum. Simazine removal was quantified in soil by HPLC and simazine degrading-catabolic activities (ACDS) was determined by a Most Probable Number method. In addition, cultivation-independent methods (clone libraries, T-RFLP and FISH) were performed to analyse soil diversity and to study the microbial community changes during bioaugmentation processes.

The results showed that simazine sorption to soil matrix was moderate, suggesting that simazine adsorption is mainly governed by simazine-organic matter and simazine-clay interactions. Microcosm results demonstrated that bioaugmentation strongly increased simazine removal and ACDS in soils without history of simazine application. In soil with history of simazine application natural attenuation was observed. However, the inoculation of strain MHP41 reduces the simazine half life and increase ACDS. In field, natural attenuation was the main process governing the simazine removal. A high microbial diversity was observed in the studied agricultural soil and *Achaea* was detected in agricultural soil. During bioaugmentation with strain MHP41, microbial community changes were observed. Bioaugmentation promote changes in the microbial structure and the relative abundances of specific phylogenetic groups, such as *Alphaproteobacteria*, *Acidobacteria* and *Planctomycetes*.

In conclusion, the combination of traditional microbiology techniques and modern culture-independent approaches are useful to understand the catabolism of toxic compounds in complex environments. This research contributes to the development of novel biotechnologies for the clean-up of contaminated soils.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	iii
ABSTARCT	iv
INDICE GENERAL	v
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xiv
I. INTRODUCCIÓN	
1. Plaguicidas y agricultura moderna	1
1.1 Plaguicidas como contaminantes en el medio ambiente	2
1.2 Herbicidas s-triazinas, una clase de plaguicidas organoclorados	3
1.2.1 Problemática del empleo de herbicidas	5
1.2.2 Empleo de s-triazinas en Chile	6
1.2.3 Toxicidad e impacto ambiental de herbicidas s-triazinas	8
1.3 Comportamiento de los herbicidas en los suelos y procesos que determinan su dinámica	9
2. Biodegradación s-triazinas: aislamiento y caracterización de bacterias degradadoras	12
2.1 Ruta catabólica de los herbicidas s-triazinas	14
3. Biorremediación	16
3.1 Factores que afectan la biorremediación	18
3.2 Estrategias de biorremediación <i>in situ</i> : bioaumentación	20
3.3 Aproximación experimental de la biorremediación: estudios a escala de microcosmos y campo	21
4. Ecología microbiana: microorganismos en la biosfera	22
4.1 El suelo como hábitat para los microorganismos: “la caja negra”	23
4.2 Mundo microbiano del suelo: la apertura de “la caja negra”	25
4.2.1 Técnicas moleculares basadas en ácidos nucleicos: el RNA ribosomal para análisis de la composición de comunidades microbianas de suelos	26
4.2.2 Ecología microbiana molecular: dos enfoques para conocer la diversidad natural del suelo	27

4.3 La dinámica y estructura de las comunidades durante estrategias de biorremediación	29
II. HIPÓTESIS	31
III. OBJETIVOS	31
IV. PLAN DE TRABAJO	32
V. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Reactivos	34
2. Cepas bacterianas	34
3. Medios y condiciones de cultivo	
3.1 Conservación de cepas	35
3.2 Crecimiento bacteriano	36
3.2.1. Preparación de preinóculos	36
3.2.2. Preparación del cultivo	36
4. Suelos agrícolas	37
4.1 Caracterización del suelo	40
5. Estudios de adsorción de simazina en suelos	
5.1 Isotermas de adsorción	41
5.2 Entalpía de adsorción	43
6. Estudios de biorremediación de simazina a escala de microcosmos	
6.1 Diseño experimental	44
6.2 Perturbación de la microbiota nativa del suelo	46
6.3 Empleo de plantas en microcosmos	47
6.4 Bioaumentación con <i>Pseudomonas</i> sp. MHP41	48
6.5 Toma de muestras y análisis realizados	48
7. Estudios de biorremediación de simazina a escala de campo	
7.1 Diseño experimental	50
7.2 Bioaumentación con <i>Pseudomonas</i> sp. MHP41	51
8. Métodos de biología molecular	
8.1 Extracción de DNA genómico	52
8.2 Extracción de DNA comunitario desde suelo agrícola	52
8.3 Visualización y cuantificación de DNA	53
8.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	53

8.5 Purificación de DNA	54
8.6 Digestión de DNA con endonucleasas de restricción y análisis de polimorfismo mediante ARDRA	54
9. Librerías génicas de suelos agrícolas	
9.1 Selección de clones	55
9.2 Secuenciación del fragmento del gen 16S rRNA clonado	56
9.3 Análisis de las secuencias	56
9.4 Análisis de rarefacción y cálculo de índices de diversidad	57
10. Análisis de la dinámica de la comunidad microbiana de suelos agrícolas	
10.1 Hibridación <i>In Situ</i>	58
10.1.1 Fijación de las muestras de suelos	61
10.1.2 Preparación de la muestra en filtros	62
10.1.3 Determinación de abundancia de microorganismos mediante tinción con DAPI	63
10.1.4 Reacción de Hibridación	63
10.1.5 Reacción de Hibridación	64
10.1.6 Etapa de lavado	64
10.2 Análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción terminales	66
10.2.1 Amplificación del gen 16S rRNA del DNA comunitario de suelo	66
10.2.2 Purificación y cuantificación del DNA	67
10.2.3 Digestión de los productos de PCR y electroforesis capilar	67
10.2.4 Análisis de datos y estadística	68
11. Análisis estadístico	69

VI. RESULTADOS

1. Caracterización de la bacteria <i>Pseudomonas</i> sp. MHP41	70
2. Caracterización de suelos agrícolas	71
3. Estudios de adsorción de simazina en suelos agrícolas	72
4. Inmovilización de <i>Pseudomonas</i> sp. MHP41 en matriz de alginato de sodio	75
5. Bioaumentación con la cepa bacteriana MHP41 en microcosmos de suelo	77
5.1 Suelos agrícolas sin historial de aplicación de herbicidas s-triazinas	78
5.2 Suelos agrícolas con historial de aplicación de herbicidas s-triazinas	81
6. Efecto de la perturbación de la microbiota y la presencia de plantas sobre	

la biodegradación de simazina en suelos	83
6.1 Efecto de la perturbación de la microbiota nativa sobre la atenuación de simazina	83
6.2 Rol de la presencia de plantas en procesos de biorremediación	85
7. Diversidad y estructura de las comunidades microbianas de suelo	87
8. Dinámica de las comunidades microbianas en suelos agrícolas	94
8.1 Cuantificación de grupos filogenéticos por hibridación <i>in situ</i>	94
8.2 Análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción terminales	98
8.2.1 Análisis de T-RFLP con la enzima de restricción <i>HhaI</i>	98
8.2.2 Análisis de T-RFLP con la enzima de restricción <i>MspI</i>	103
9. Estudios de bioaumentación con la cepa bacteriana MHP41 en suelos agrícolas con simazina a escala de campo	104
VII. DISCUSIÓN	107
VIII. CONCLUSIONES	119
IX. PROYECCIONES	121
X. REFERENCIAS	122
ANEXOS	
Anexo I: Figuras y tablas	143
Anexo II: Publicaciones y patentes	147
Anexo III: Asistencia a eventos científicos	149
Anexo IV: Financiamientos y becas	153

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Volumen de plaguicidas importados según clase de uso, expresado en kg/l y % durante el año 2006.
- Tabla 2. Listado de plaguicidas de uso doméstico prohibidos y restringidos en Chile por el SAG en el año 2003.
- Tabla 3. Beneficios económicos de la biorremediación en casos reales.
- Tabla 4. Principales factores que afectan la biorremediación.
- Tabla 5. Estudios exitosos de biorremediación de lodos y suelos contaminados mediante la utilización de inóculos bacterianos (bioaumentación).
- Tabla 6. Abundancia de especies de *Bacteria* y *Archaea* en diferentes ecosistemas de suelo.
- Tabla 7. Tratamiento experimental de suelo agrícola tipo A sin historial de aplicación de simazina.
- Tabla 8. Tratamientos experimentales de suelo agrícola tipo B con historial de aplicación.
- Tabla 9. Sondas empleadas para FISH y sus respectivas condiciones de hibridación.
- Tabla 10. Porcentaje de especificidad de grupo de las sondas de oligonucleótidos de FISH seleccionadas para el análisis de las comunidades microbianas de suelos agrícolas.
- Tabla 11. Protocolo de preparación de la mezcla de hibridación según los porcentajes de formamida requeridos para cada sonda.
- Tabla 12. Protocolo de preparación del buffer de lavado según los porcentajes de formamida requeridos para cada sonda.
- Tabla 13. Propiedades físico-químicas e historia agrícola de cada tipo de suelo.
- Tabla 14. Coeficientes y parámetros determinados a las 24 horas para los modelos Lineal y Freundlich que describen la adsorción de simazina en los dos tipos de suelos agrícolas estudiados.
- Tabla 15. Secuencias completas del gen 16S rRNA de clones representativos de cada uno de los grupos filogenéticos obtenidos en las librerías génicas de suelos agrícolas.
- Tabla 16. Estimación de la abundancia de microorganismos en suelos agrícolas durante ensayos de biorremediación con la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41.

- Tabla 17. Recuento de heterótrofos cultivables durante experimentos de bioaumentación a escala de campo.
- Tabla A1. Coeficientes de distribución K_d para simazina en suelos agrícolas.
- Tabla A2. Coeficiente de distribución (K_f), valores de n y r^2 para simazina en suelos agrícolas.
- Tabla A3. Valores de los parámetros del modelo de Langmuir requeridos para el cálculo de la entalpía de adsorción de simazina en suelo agrícola.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Creación artística que ilustra la aplicación de plaguicidas en la antigüedad.
- Figura 2. Estructura química de los herbicidas s-triazinas y sus congéneres.
- Figura 3. Principales causas de la presencia de los plaguicidas (herbicidas) en el suelo.
- Figura 4. Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el suelo.
- Figura 5. Cepa modelo de la degradación de compuestos s-triazinas *Pseudomonas* sp. ADP.
- Figura 6. Caracterización de la bacteria degradadora de s-triazinas *Pseudomonas* sp. MHP41.
- Figura 7. Vía catabólica de simazina.
- Figura 8. Horizontes del suelo y composición de las micropartículas de suelo.
- Figura 9. Descripción del ciclo completo del rRNA para el estudio de la diversidad microbiana natural del medio ambiente.
- Figura 10. Cultivos optimizados de *Pseudomonas* sp. MHP41 mediante influjo continuo de aire estéril.
- Figura 11. Localización de la comuna de Pochay en la región de Valparaíso.
- Figura 12. Serie de los suelos de la región de Valparaíso.
- Figura 13. Proceso de tamizado de los suelos.
- Figura 14. Diseño experimental en estudios de bioaumentación de simazina por *Pseudomonas* sp. MHP41 a escala de microcosmos.
- Figura 15. Tratamiento con radiación gamma de suelos tipo B.
- Figura 16. Germinación de semillas de maíz empleadas en los microcosmos con plantas.
- Figura 17. Sitios en estudio de bioaumentación de simazina por *Pseudomonas* sp. MHP41 a escala campo.
- Figura 18. Esquema del protocolo general empleado para la técnica de hibridación *in situ* (FISH).
- Figura 19. Esquema del protocolo de fijación de las muestras de suelo para FISH.
- Figura 20. Esquema del protocolo general empleado para el análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP).

- Figura 21. Ribotipificación de la cepa MHP41.
- Figura 22. Zonas de muestreo de los suelos agrícolas, en la provincia de Quillota.
- Figura 23. Células de la bacteria *Pseudomonas* sp. MHP41 inmovilizadas en matriz de alginato.
- Figura 24. Viabilidad y degradación de simazina por *Pseudomonas* sp. MHP41 inmovilizada.
- Figura 25. Microcosmos de suelo agrícola tipo A empleados en los estudios de biorremediación.
- Figura 26. Efecto de la bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 inmovilizada sobre la atenuación de simazina en suelo agrícola sin historial de aplicación de simazina.
- Figura 27. Estimación de la ACDS en microcosmos de suelo sin historial tratados con simazina (100 ppm).
- Figura 28. Efecto de la bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 inmovilizada sobre la atenuación de simazina y la ACDS en suelo agrícola sin historial de aplicación de simazina
- Figura 29. Efecto de la bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 inmovilizada sobre la atenuación de simazina en suelos con historial de aplicación de simazina.
- Figura 30. Estimación de la ACDS de simazina en microcosmos de suelo con historial tratados con simazina (13 ppm) durante experimentos de bioaumentación.
- Figura 31. Efecto de la perturbación de la microbiota nativa sobre la degradación de simazina en suelo durante estrategias de bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41.
- Figura 32. Estimación de la actividad de microorganismos degradadores de simazina en suelo con historial de aplicación de simazina perturbado mediante irradiación gamma.
- Figura 33. Efecto de la presencia de plantas en la remoción del herbicida simazina en microcosmos de suelo tipo B.
- Figura 34. Estimación de la actividad de microorganismos degradadores de simazina (ACDS) en microcosmos de suelo tipo B y en presencia de plantas.
- Figura 35. Árbol filogenético construido a partir de secuencias parciales del gen 16S rRNA de los clones obtenidos y aquellos contenidos en la base de datos SILVA-SSU.
- Figura 36. Diversidad bacteriana en suelos agrícolas.

- Figura 37. Distribución de la diversidad bacteriana en suelos agrícolas según el historial de aplicación del herbicida simazina.
- Figura 38. Dinámica de las comunidades microbianas detectadas por FISH durante el ensayo con bioaumentación de *Pseudomonas* sp. MHP41.
- Figura 39. Extracción de DNA desde muestras de suelos y amplificación del gen 16S rRNA.
- Figura 40. Perfiles de restricción con la enzima HhaI de muestras de suelo sin historial de aplicación de simazina (suelo A) durante ensayos de bioaumentación con la cepa MHP41.
- Figura 41. Perfiles de restricción con la enzima HhaI de muestras de suelo con historial de aplicación de simazina (suelo B) durante ensayos de bioaumentación con la cepa MHP41.
- Figura 42. Análisis multivariado (NMDS) de los TRFs obtenidos a partir de la restricción del gen 16S rRNA con endonucleasa HhaI desde muestras de suelo agrícola durante ensayos de bioaumentación con *Pseudomonas* sp. cepa MHP41.
- Figura 43. Efecto de la bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 inmovilizada sobre la atenuación de simazina (100 ppm) en estudios a escala de campo.
- Figura 44. Estimación de la ACDS de simazina durante experimentos de bioaumentación a escala de campo (100 ppm).
- Figura A1. Isotermas de adsorción para simazina en suelos agrícolas a las 1, 6, 12, 24 y 48 horas.
- Figura A2. Ejemplificación de las regresiones lineales realizadas para obtener los coeficientes de distribución de simazina en suelo según el ajuste del modelo lineal.
- Figura A3. Ejemplificación de las regresiones lineales realizadas para obtener los coeficientes de distribución de simazina en suelo, según el ajuste del modelo de Freundlich.
- Figura A4. Isotermas de adsorción para suelos agrícolas a 25 y 35° C.

ABREVIATURAS

ACDS	:	Actividad catabólica de degradadores de simazina
ANOVA	:	Análisis de varianza
ARDRA	:	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
CCHEN	:	Comisión Chilena de Energía Nuclear
CTAB	:	Bromuro de hexadecylmetilamonio
DAPI	:	Dicloruro de 4,6-diamidino-2-fenilindol
EEA	:	European Environmental Agency
EPA	:	U.S. Environmental Protection Agency
FAO	:	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación
FISH	:	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
HPLC	:	High-Performance Liquid Chromatography
MM	:	Medio mínimo
MO	:	Materia orgánica
NMDS	:	Non-Metric Multidimensional Scaling
NMP	:	Número más probable
p	:	Valor de significancia estadística
PAN	:	Pesticide Action Network
pb	:	Pares de bases
PCR	:	Polymerase chain reaction
RHC	:	Recuento de heterótrofos cultivables
SAG	:	Servicio Agrícola Ganadero
SDS	:	Dodecilsulfato sódico
T-RFLP	:	Terminal Restriction Fragment Length Polimorphisms
TRFs	:	Terminal Restriction Fragment(s)
TSA	:	Medio agar con soja tréptica
TTZ	:	Trifenil tetrazolio
UFC	:	Unidades formadoras de colonias

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCION

1. Plaguicidas y agricultura moderna

En la actualidad no es posible desarrollar una agricultura con altos rendimientos sin la utilización de medidas de protección de plantas, entre las cuales los plaguicidas químicos o “agroquímicos” siguen teniendo una participación significativa. Pero los enfoques han cambiado considerablemente. El comienzo de los plaguicidas favoreció al incremento de la producción alimentaria y contribuyó a la salud humana a través del control de malezas, insectos y agentes patógenos vectores de enfermedades. Hoy se concibe el uso de los plaguicidas enmarcado dentro de un manejo integrado de plagas, enfermedades y malezas, lo que obliga a conocer profundamente las propiedades de estos compuestos, sus residuos en los cultivos y en el medio, así como sus aspectos toxicológicos.

Los plaguicidas se definen como “cualquier sustancia química, preparación u organismo usados para destruir, mitigar o controlar plagas”. Los plaguicidas principalmente utilizados con fines agrícolas, control de hierbas en caminos y vías férreas u otros propósitos tales como el control de enfermedades en la salud pública. El origen de algunos de los actuales métodos de lucha contra las plagas se remonta hasta hace dos mil años (Fig. 1). Sin embargo, el empleo sistemático de plaguicidas en la agricultura se inició hace algo más de cien años y su consumo ha ido aumentando. Actualmente la producción mundial es de unos diez millones de toneladas, y la mayor producción mundial se concentra en Europa y EE.UU (FAO *Statistical Database*).

Los plaguicidas poseen características contaminantes que dependen principalmente de sus propiedades tóxicas, las cuales se definen por la concentración de éste en un momento dado en el ambiente y la sensibilidad de los organismos vivos afectados. Según su naturaleza química, los plaguicidas pueden clasificarse en inorgánicos y orgánicos. Los primeros no plantean, en general, una problemática importante desde el punto de vista de su toxicidad y evolución en el suelo. Por el contrario los plaguicidas orgánicos son el grupo más amplio de componentes químicos potencialmente tóxicos que se han introducido

voluntariamente al medio ambiente, e incluyen amplia gama de productos que van desde insecticidas, herbicidas y fungicidas, entre otros. En general, de la cantidad total de plaguicida aplicada, la proporción que tomá contacto directo con el objetivo es solo un porcentaje mínimo, por lo que es probable encontrar especies, comunidades o ecosistemas completos con efectos colaterales indeseables.



Figura 1. Creación artística que ilustra la aplicación de plaguicidas en la antigüedad. (Fuente: Sánchez Martín y Sánchez Camazano, 1984).

1.1. Plaguicidas como contaminantes en el medio ambiente

Una vez introducidos los plaguicidas en el medio ambiente, y como consecuencia de la cantidad empleada, su amplio espectro de aplicación y sus propiedades fisicoquímicas, están sujetos a una serie de procesos de conversión y transporte, por lo que se encuentran

en todos los compartimientos del medio ambiente, tales como sedimentos, aguas superficiales y subterráneas, atmósfera y suelos. El transporte global de estas sustancias, ha sido demostrado por su presencia en alimentos, aguas, suelos, fluidos biológicos, etc. (Dean *et al.*, 1996; Ahmed, 2001; Barr y Needham, 2002; Berrada *et al.*, 2003) y en lugares tan remotos como la Antártida o el Ártico y en el aire de océanos del mundo (Barriuso, 2000). Se han informado cifras tan impactantes, como que se calcula que anualmente se consume más de medio kilo de pesticida por persona (Coscollá, 1993).

La contaminación por agroquímicos impacta las diferentes matrices del medio ambiente. La contaminación del aire por químicos volátiles que se puede dispersar fácilmente por el viento u otros elementos climáticos. La contaminación del suelo que si bien es localizada, actúa como reservorio y es un sistema mucho más complejo y difícil de recuperar. La contaminación de las aguas superficiales y subterráneas, fuentes vitales para el planeta, es importante ya que conlleva un proceso de reversibilidad muy lento y usualmente de expansión rápida y masiva.

La toxicidad de estos compuestos presenta varios aspectos: peligrosidad en su fabricación y formulación, peligrosidad para el agricultor que entra en contacto con ellos, peligrosidad ecológica asociada a desequilibrios en el medio ambiente y peligrosidad para el consumidor. A pesar de todos los inconvenientes que plantean, difícilmente se puede prescindir de su uso en el estado actual de desarrollo de nuestra agricultura.

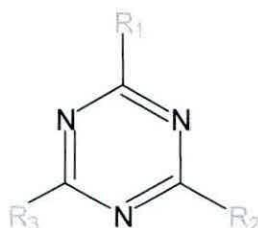
1.2. Herbicidas s-triazinas, una clase de plaguicidas organoclorados

Los herbicidas, que constituyen una importante clase de plaguicidas, son aplicados al suelo para el control de malezas (Curran, 1998) y su uso se ha extendido de manera considerable. En los países en desarrollo, el empleo de estos pesticidas representan alrededor de un cuarto del consumo mundial de herbicidas (FAO, 2004).

Durante la década del 1950 los herbicidas organoclorados del tipo s-triazina fueron desarrollados para la actividad agrícola siendo exitosamente aceptados en el mercado mundial. Actualmente son considerados uno los herbicidas más empleados en el mundo

(Gebendinger *et al.*, 1998, Graymore *et al.*, 2001, Barra Caracciolo *et al.*, 2005). La familia de los herbicidas s-triazinas son derivados heterocíclicos del nitrógeno (Fig. 2) e incluyen una amplia gama de congéneres como: atrazina, simazina, cianazina, propazina, terbutilazina, entre muchos otros compuestos, las cuales difieren entre sí por la sustitución y posición de los radicales alrededor de un anillo (Fig.2).

Los herbicidas triazínicos son moléculas de baja solubilidad y han sido catalogados como relativamente persistentes en el ambiente debido a su alta masa molecular, su tendencia a formar iones y la presencia de grupos químicos que incrementan la afinidad de la molécula por la superficie del suelo (Curran, 1998; Santiago-Mora *et al.*, 2005; Gunasekara, 2007). Por ejemplo, para simazina se han documentado tiempos de vida media en el suelo que varían de semanas a meses, dependiendo de las características del suelo y del número de aplicaciones (Santiago-Mora *et al.*, 2005). Estudios revelan presencia de simazina en el suelo 4 años después de la última aplicación (Cogger *et al.*, 1998). Además este compuesto presenta otra característica adversa como su movilidad hacia las capas acuíferas subterráneas (Gunasekara, 2007; Cox *et al.*, 2000; Troiano *et al.*, 2001).



SUSTITUYENTES			s-Triazina
R1	R2	R3	
Cl	NHC ₂ H ₅	NHCH(CH ₃) ₂	Atrazina
OH	NHC ₂ H ₅	NHCH(CH ₃) ₂	Hidroxyatrazina
Cl	NHC ₂ H ₅	NHC ₂ H ₅	Simazina
Cl	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH(CH ₃) ₂	Propazina
Cl	NHC ₂ H ₅	NHCH(CH ₃) ₃	Terbutilazina
OH	OH	OH	Ácido cianúrico
F	NHC ₂ H ₅	NHCH(CH ₃) ₂	Fluoro atrazina
SCH ₃	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH(CH ₃) ₂	Prometrina

Figura 2. Estructura química de los herbicidas s-triazinas y sus congéneres.

Los herbicidas s-triazinas son empleados para el control de malezas en zonas agrícolas y forestales, como así también en suelos no cultivables: vías ferroviarias, autopistas, etc. (Ying *et al.*, 2005, ANASAC, 2007). Se aplican como herbicidas pre- y post emergentes. Son incorporadas a través de las raíces de las plantas actuando a nivel del transporte fotosintético de los electrones, inhibiendo la actividad del fotosistema II de los vegetales, provocando el amarillamiento y muerte de la planta (Wackett *et al.*, 2001, Ralebisto *et al.*, 2002, Gunasekara *et al.*, 2007). Debido a su bajo grado de especificidad, resultan ser compuestos tóxicos para numerosas especies vegetales, permitiendo el control de una amplia variedad de malezas en cultivos de gran importancia económica mundial como maíz, espárragos, cítricos, paltas, etc.

1.2.1 Problemática del empleo de herbicidas.

Las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, Statistical Database), realizadas durante los comienzos del siglo XXI revelan que el consumo de herbicidas tanto en la Unión Europea (UE) como en América es elevado. De acuerdo a dichas estadísticas, los países pertenecientes a la UE registran un consumo de 1,4 millones de toneladas de herbicidas entre 1990 y 2000. Las mayores proporciones de utilización de herbicidas están en manos de Francia (25%), Gran Bretaña (17%), Italia (14%) y Alemania (12%), (FAO, Statistical Database). En la UE los herbicidas detectados con mayor frecuencia en suelos agrícolas son: s-triazinas (66%), organofosforados (56%) y organoclorados (38%) (Garrido *et al.*, 1998). En los países del este de Europa el 85% de los suelos cultivables son tratados con herbicidas al menos una vez al año (Engelen *et al.*, 1998). Durante la misma década, Estados Unidos se posiciona como el primer consumidor mundial de herbicidas, con un consumo total de 1,6 millones de toneladas de herbicidas. En los países de América del Sur la utilización total de herbicidas entre 1990 y 2000 asciende a 670.000 toneladas, donde Brasil (34%), Argentina (30%) y Colombia (17%) representan los mayores niveles de consumo, mientras que Chile tiene una participación activa del 7% en Sudamérica (FAO, Statistical Database). En Chile, los herbicidas representan el mayor porcentaje (35%) del total de las importaciones de plaguicida durante el año 2006 (Servicio Agrícola Ganadero (SAG), Tabla 1).

Tabla 1. Volumen de plaguicidas importados según clase de uso, expresado en kg/L y % durante el año 2006. Fuente: Servicio Agrícola Ganadero (SAG).

Nº SERIE	Kg/L	%
Serie 1.000 Insecticidas, Rodenticidas, Nematicidas y otros	4.653.122,21	24,74%
Serie 2.000 Fungicidas y Bactericidas	5.286.678,80	28,10%
Serie 3.000 Herbicidas	6.662.823,03	35,42%
Serie 4.000 Misceláneos	2.208.301,76	11,74%
No Clasificados	278,04	0,001%
TOTAL	18.811.203,84	100,00%

1.2.2 Empleo de s-triazinas en Chile.

Los cultivos agrícolas de mayor importancia en Chile son tratados con herbicidas pre-emergentes del tipo s-triazinas tales como la atrazina o la simazina, con un consumo de 181 toneladas y 160 toneladas, respectivamente, durante el año 2004 (SAG, 2004). El 90% del total de simazina se aplica en plantaciones forestales de pino y eucaliptus (Cooman *et al.*, 2004). El resto se aplica en predios de producción de manzanos, espárragos, moras, maíz, paltos, cítricos y viñedos. Por ejemplo, la producción de palta es uno de los rubros frutícolas que mayor desarrollo ha presentado en la última década y es la tercera en importancia después de la vid de mesa y manzano según los últimos catastros frutícolas realizados por el Centro de Información de Recursos Naturales (CIREN) y en colaboración de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) durante el 2004 (CIREN, 2004). El CIREN, informó del aumento superior al 80% en los últimos 10 años en las plantaciones de palta a nivel nacional, registrando un total de aproximadamente 26.731 ha con este cultivo en el país. El mayor porcentaje de las plantaciones de paltos se ubica en la V Región, con una participación nacional de 56% (Gil, 2006). Esto demuestra el consecuente incremento en el uso de herbicidas clorados necesario para mantener una alta productividad en suelos agrícolas de la V Región.

En nuestro país, el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) es la entidad responsable de controlar el empleo de agroquímicos y el no uso de productos prohibidos. Conscientes de la

problemática, actualmente en Chile se ha establecido el no uso de más de 10 agroquímicos (Tabla 2). No obstante, atrazina o simazina no se encuentran entre las prohibiciones y restricciones. Numerosos países ya han normado y/o restringido su empleo [EU, 2004; EPA, 2007]. El empleo de herbicidas clorados y específicamente de s-triazinas es aún poco fiscalizado y es prioritario en Chile, adoptar las medidas adecuadas para garantizar al usuario que los productos que puede adquirir en el mercado son suficientemente seguros para la salud y el ambiente.

Tabla 2. Listado de plaguicidas de uso domestico prohibidos y restringidos en Chile por el SAG en el año 2003.

RESTRICCIONES Y PROHIBICIONES AL USO DE PLAGUICIDAS DE USO DOMESTICO.
SAG, Año 2003

PROHIBICIONES	
PRODUCTO	AÑO
- Monofluoracetato de Sodio o compuesto 1080	1982
- DDT.	1984
- Dibromuro de Etileno	1985
- Dieldrim, Endrin, Heptocloro y Clordán	1987
- Aldrin	1988
- Daminozide	1989
- Sales orgánicas o inorgánicas de mercurio	1993
Mevintos	1994
- 2,4,5-T, Clodimeform, Toxafeno o Canfeclor	1998
- Lindano, uso agrícola	1998
- Paratión Etilo y Metilo	1999
- Pentaclorobenceno	1999
- Restringe Paraquat	2001
- Hexaclorobenceno	2002
- Mirex	2002
RESTRICCIONES	
- Nivel máximo de residuos de clorados en empastado	1986
- Paraquat	2001

Fuente: Servicio Agrícola Ganadero

1.2.3. Toxicidad e impacto ambiental de herbicidas s-triazinas

El uso excesivo de s-triazinas y otros herbicidas en la agricultura, derrames accidentales, lavado inadecuado de tanques contenedores, filtraciones en los depósitos de almacenamientos y residuos descargados en el suelo han provocado que se conviertan en un grave problema ambiental, con riesgo para los sistemas bióticos y abióticos y representando un claro peligro para la salud pública (Sanborn *et al.*, 2002). Numerosos estudios de laboratorio y de campo han revelado el impacto biológico de la contaminación con atrazina, y su efecto sobre los anfibios (Kosanke *et al.*, 1988; Hayes *et al.*, 2003) y mamíferos (Graymore *et al.*, 2002; Biradar *et al.*, 1995). Además, producen efectos adversos sobre la salud humana actuando como disruptores endocrinos y posibles carcinógeno humano clase C (FIFRA, 2000; Birnbaum and Fenton, 2003; Hayes *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2007).

Estudios de la European Environmental Agency (EEA) sobre la contaminación de aguas continentales indican que los plaguicidas más frecuentemente encontrados en aguas subterráneas son atrazina y simazina, y sus metabolitos. Se han detectado niveles que exceden los máximos permitidos en regiones como Eslovenia, Austria, Alemania, Francia y el Reino Unido (EEA, 1998). En Estados Unidos se han realizado exhaustivos catastros de presencia de s-triazinas. Atrazina ha sido la más comúnmente detectada en niveles que exceden los permitidos en aguas subterráneas (Gunasekara *et al.*, 2007) y en aguas superficiales (Battaglin *et al.*, 1999). Estudios de detección de s-triazinas y sus metabolitos realizados por Troiano indican que simazina es más frecuentemente detectado que atrazina en aguas subterráneas de California (EPA California, 2001, Troiano, 2002, Barra Caracciolo *et al.*, 2005). En Australia, simazina y atrazina, también pertenecen a la lista de los pesticidas más comúnmente detectados en aguas subterráneas y superficiales (Ying *et al.*, 2004).

En Chile, a pesar de las altas tasas de aplicación de herbicidas s-triazinas no existen suficientes estudios sobre la presencia de estos compuestos en el medio ambiente. Un estudio sobre la dinámica de simazina en suelos de viñedos en la Región de Valparaíso determinó que simazina puede lixiviar hasta 90 cm de profundidad bajo las condiciones climáticas imperantes y las características del suelo (Alister *et al.*, 2005). Análisis de toxicidad en el río Chillán, Región del Biobío, documentan que atrazina es el único pesticida

presente en concentraciones sobre el nivel de toxicidad para *Daphnia* sp. (Cooman *et al.*, 2004).

Dado el impacto de los herbicidas s-triazina y de sus metabolitos en la salud humana y el medioambiente, se han establecido diferentes marcos regulatorios para controlar la aplicación y comercialización de esta clase de herbicidas. En las naciones pertenecientes a la Unión Europea desde el año 2007 atrazina y simazina deben ser retiradas del mercado (PAN Europe, 2006). En EEUU la EPA ha establecido que el nivel máximo de contaminante (NMC) en agua potable para atrazina es 3 µg/L y para simazina 4 µg/L. En Canadá, la Canadian Water Quality Guidelines restringe la concentración de atrazina y simazina en agua potable a 5 µg/L y 10 µg/L, respectivamente (Federal-Provincial-Territorial Comité on Drinking Water, 2006). En Australia la restricción es de 13 µg/L desde el año 2001 (Vancov *et al.*, 2005). Asimismo, la South African Water Quality Guidelines desde el año 1996 restringe la concentración de atrazina en agua potable a 2 µg/L (Ralebisto *et al.*, 2002). En Chile, la Norma de Calidad para la Protección de Aguas Continentales Superficiales establece como máximos niveles permitidos para atrazina 60 µg/L y para simazina 50 µg/L (Decreto N° 87/01). La Norma Chilena para Agua Potable no establece niveles máximos para herbicidas s-triazinas (NCh 409/1. Of. 2005).

1.3. Comportamiento de los herbicidas en los suelos y procesos que determinan su dinámica

La presencia de los herbicidas en el suelo se produce por diversas vías que se encuentran representadas en la Figura 3. Las vías principales por las que los herbicidas llegan al suelo son su aplicación directa (1), ya sea cuando se aplican a las partes aéreas de las plantas o a la superficie del suelo (2). Como gran parte del herbicida aplicado no alcanza el objetivo deseado, que es la planta, este se deposita sobre la superficie del suelo. También puede producirse por escorrentía por el agua o el viento del herbicida que se ha depositado sobre la planta (3) así como por arrastre de restos suspendidos en la atmósfera por la lluvia o el viento (4). En menor proporción, los herbicidas pueden llegar al suelo a través de restos vegetales desprendidos o que quedan en el suelo al cosechar (5).

Esto obliga a prestar una atención especial a la dinámica de los herbicidas en el suelo y su tránsito hacia las aguas. En el suelo la dinámica de los herbicidas está compuesta por una serie de procesos los cuales determinan su disposición final (Fig. 4).

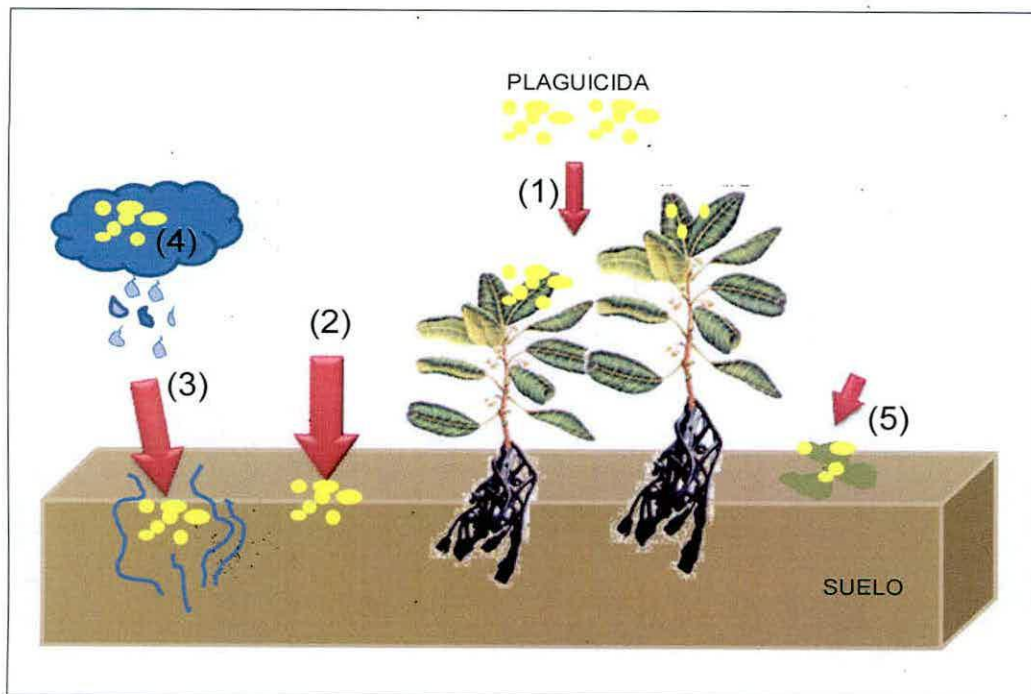


Figura 3. Principales causas de la presencia de los plaguicidas (herbicidas) en el suelo. Las vías principales por las que los herbicidas llegan al suelo son: (1) su aplicación directa, (2) cuando se aplican a la superficie del suelo, (3) escorrentía por el agua o el viento, (4) arrastre de restos suspendidos en la atmósfera por la lluvia o el viento y (5) a través de restos vegetales.

Dichos procesos son:

- **Descomposición química.** En el suelo ocurren diferentes reacciones químicas que pueden conducir a la inactivación total del herbicida: oxidación, reducción, hidrólisis e hidratación, ruptura de anillos, hidroxilación, desalquilación, etc.
- **Descomposición fotoquímica.** En la superficie del suelo la absorción de radiación ultravioleta aumenta el nivel de energía de la molécula del herbicida, provocando alteraciones estructurales de la misma.

- **Volatilización.** Es la tendencia que exhibe la molécula de herbicida para volatilizarse dependiendo de su presión de vapor, del estado físico en que se encuentre y de la temperatura ambiente.
- **Movimiento.** El transporte de un herbicida en el suelo, por disolución o arrastre mecánico ocurre bajo la influencia del agua. El grado de lixiviación depende de las propiedades fisicoquímicas del suelo, solubilidad del producto, frecuencia e intensidad de la lluvia, etc.
- **Adsorción mediada por plantas.** La mayoría de los herbicidas adicionados al suelo son fácilmente adsorbidos por las raíces, tallos emergentes y otros órganos subterráneos como consecuencia de los procesos metabólicos de las plantas.
- **Adsorción a los coloides del suelo.** El fenómeno de la adsorción está influenciado por la capacidad de intercambio iónico entre los coloides de la solución y el herbicida.
- **Biodegradación microbiana.** La acción de los microorganismos del suelo sobre los herbicidas es probablemente uno de los mecanismos de descomposición más importante (Radosevich *et al.*, 1995; Gebendinger *et al.*, 1998, Newcombe *et al.*, 1999; Margesin and Shinner, 2001).

Todos los procesos están interrelacionados, por lo que un conocimiento global y simultáneo de todos ellos resulta fundamental a la hora de predecir el comportamiento del herbicida en el medio ambiente, y junto a ello, diseñar estrategias para obtener el comportamiento deseado del compuesto, es decir, una máxima eficacia del herbicida y un mínimo impacto ambiental.

Actualmente se reconoce que el mecanismo predominante de disipación de plaguicidas en el suelo es la microbiota nativa (Margesin and Shinner, 2001; Wackett y Hershberger, 2001), la cual se ve principalmente afectada por las propiedades físicas y químicas del mismo (pH, materia orgánica, humedad, etc), la frecuencia y cantidad de aplicación, tipo de cosecha y la presencia de otros plaguicidas.

Bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, entre otros microorganismos, poseen la capacidad de metabolizar herbicidas del tipo s-triazinas. En el caso particular de herbicidas s-triazina, el anillo puede presentar diferentes sustituyentes, tales como halógenos,

metiltoésteres o N-alquilo (Fig. 2), los que a su vez pueden dificultar la degradación mediada por microorganismos de los diferentes congéneres (Wackett *et al.*, 2002).

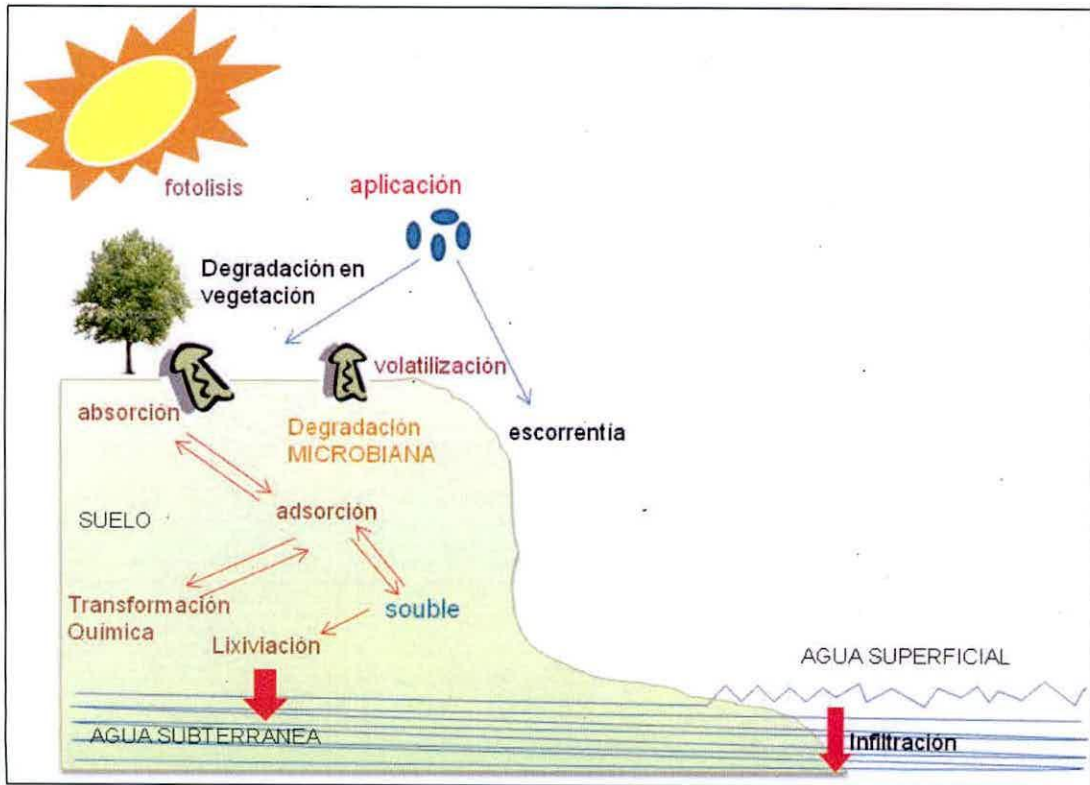


Figura 4. Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el suelo. Distribuidos por la superficie del suelo, la degradación de los herbicidas depende de varios procesos bióticos y abióticos, tales como la hidrólisis, la fotólisis y la transformación por las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo.

2. Biodegradación s-triazinas: aislamiento y caracterización de bacterias degradadoras

En la década del 80, Cook y colaboradores aislaron bacterias capaces de crecer en ácido cianúrico (intermediario de la vía de degradación de las s-triazinas) pero ninguna de ellas fue capaz de crecer en atrazina como única fuente de nitrógeno (Cook and Hütter 1981, 1984; Cook *et al.*, 1984, 1985). En la década de los 90, se aislaron una amplia variedad de cepas bacterianas con potencial capacidad de metabolizar la atrazina, pertenecientes a diferentes géneros: *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Acinetobacter*, *Cupriavidus*, *Nocardiodes* y *Agrobacterium* entre otros (Mirgain *et al.*, 1993; Assaf *et al.*, 1994; Radosevich *et al.*, 1995;

Bouquard *et al.*, 1997; Struthers *et al.*, 1998; Topp *et al.*, 2001a). No obstante, muy pocas fueron capaces de mineralizar completamente este herbicida. En 1994 Yanze-Kontchou y colaboradores describieron que *Pseudomonas* sp. cepa YAYA6 es capaz de emplear atrazina como única fuente de carbono, y de degradar simazina. En el año 1995 Mandelbaum y colaboradores aislaron *Pseudomonas* sp. ADP, una bacteria capaz de mineralizar atrazina hasta CO₂ y NH₃ cuando atrazina cuando está presente como única fuente de nitrógeno. Con el trascurso de los años, esta cepa se ha convertido en la bacteria modelo para la degradación de compuestos s-triazinas y en ella se ha descrito un plásmido catabólico (pADP-1) que contiene todos los genes *atz* que codifican las enzimas de la ruta catabólica superior (*atz ABC*) e inferior (*atz DEF*) de estos compuestos (Martínez *et al.*, 2001; De Souza *et al.*, 1998a; Strong *et al.*, 2002), (Fig. 5).

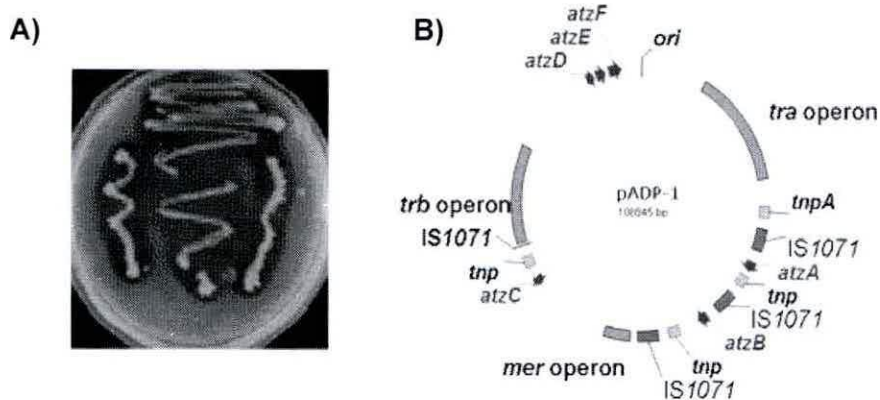


Figura 5. Cepa modelo de la degradación de compuestos s-triazinas *Pseudomonas* sp. ADP. A) Cultivo en placa de *Pseudomonas* sp. ADP en medio mínimo con atrazina como única fuente de nitrógeno. Se visualiza el halo de degradación de atrazina (zona de transparencia alrededor de la colonia), adaptado de Mandelbaum *et al.*, 1995. C) Mapa físico del plásmido pADP-1, que codifica para los genes *atz*, responsables de la degradación de atrazina, adaptado de Wackett *et al.*, 2002.

En la última década, el aislamiento y la identificación de, diversas bacterias degradadoras de s-triazinas, dejan al descubierto las capacidades catabólicas de nuevas bacterias capaces de mineralizar dichos herbicidas y de ser utilizadas en procesos de biorremediación de suelos. Topp y colaboradores (2000b), demostraron que *Pseudaminobacter* sp. C147 y C195 son capaces de mineralizar atrazina, y que *Nocardiodes* sp. C190 degrada atrazina y simazina. Rousseaux *et al.*, (2001) aislaron de suelos de Francia *Chelatobacter heintzii* Cit1, que puede mineralizar atrazina. Strong y colaboradores

(2000) aislaron *Arthrobacter aureescens* TC1 que emplea atrazina como única fuente de carbono y nitrógeno, y simazina como única fuente de nitrógeno.

En este contexto, el laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la UTFSM se ha focalizado en la problemática que representa la biorremediación de suelos tratados con herbicidas clorados. Nuestro grupo de investigación ha aislado una amplia variedad de bacterias nativas de suelos agrícolas del Valle del Aconcagua, Región de Valparaíso (Hernández *et al.*, 2008a, 2008b). La caracterización fisiológica y genética de las cepas permitió seleccionar biocatalizadores de herbicidas del tipo s-triazinas, para estrategias de biorremediación. Hernández *et al.*, (2008c) describieron el aislamiento y caracterización de la cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. MHP41, que muestra una elevada tasa de degradación de simazina cuando es cultivada en medios mínimos con simazina como única fuente de nitrógeno. Asimismo, esta bacteria posee todos los genes *atz* de las vías catabólicas de s-triazinas (Fig. 6).

2.1. Ruta catabólica de los herbicidas s-triazinas

Pseudomonas sp. ADP se ha convertido en la cepa referencial para estudios de biodegradación de s-triazinas, y sus vías de degradación de atrazina y simazina han sido completamente descritas. La ruta superior, que es codificada por los genes *atzA* (de Souza *et al.*, 1996), *atzB* (Boundy-Mills *et al.*, 1997) y *atzC* (Sadowsky *et al.*, 1998), catabolizan la atrazina hasta ácido cianúrico. Las enzimas ácido cianúrico aminohidrolasa, biuret amidohidrolasa y ureasa, codificadas por los genes *atzD*, *atzE* y *atzF* participan en la vía inferior de ruptura del anillo de s-triazina y liberación de amonio y CO₂. En *Pseudomonas* sp. ADP todos los genes necesarios para el catabolismo de atrazina y simazina hasta amonio y CO₂ están localizados en el plásmido transferible pADP-1 de 108 kpb (Fig. 5)

Las vías de degradación de simazina son similares a las de atrazina, incluyendo los 4 pasos principales: deshalogenación, N-desalquilación, desaminación y ruptura de anillo. La degradación de simazina contempla enzimas codificadas por los genes *atzA*, *atzB* y *atzC* en la vía superior y los genes *atzD*, *atzE* y *atzF* en la vía inferior (Cheng *et al.*, 2005) (Fig. 7).

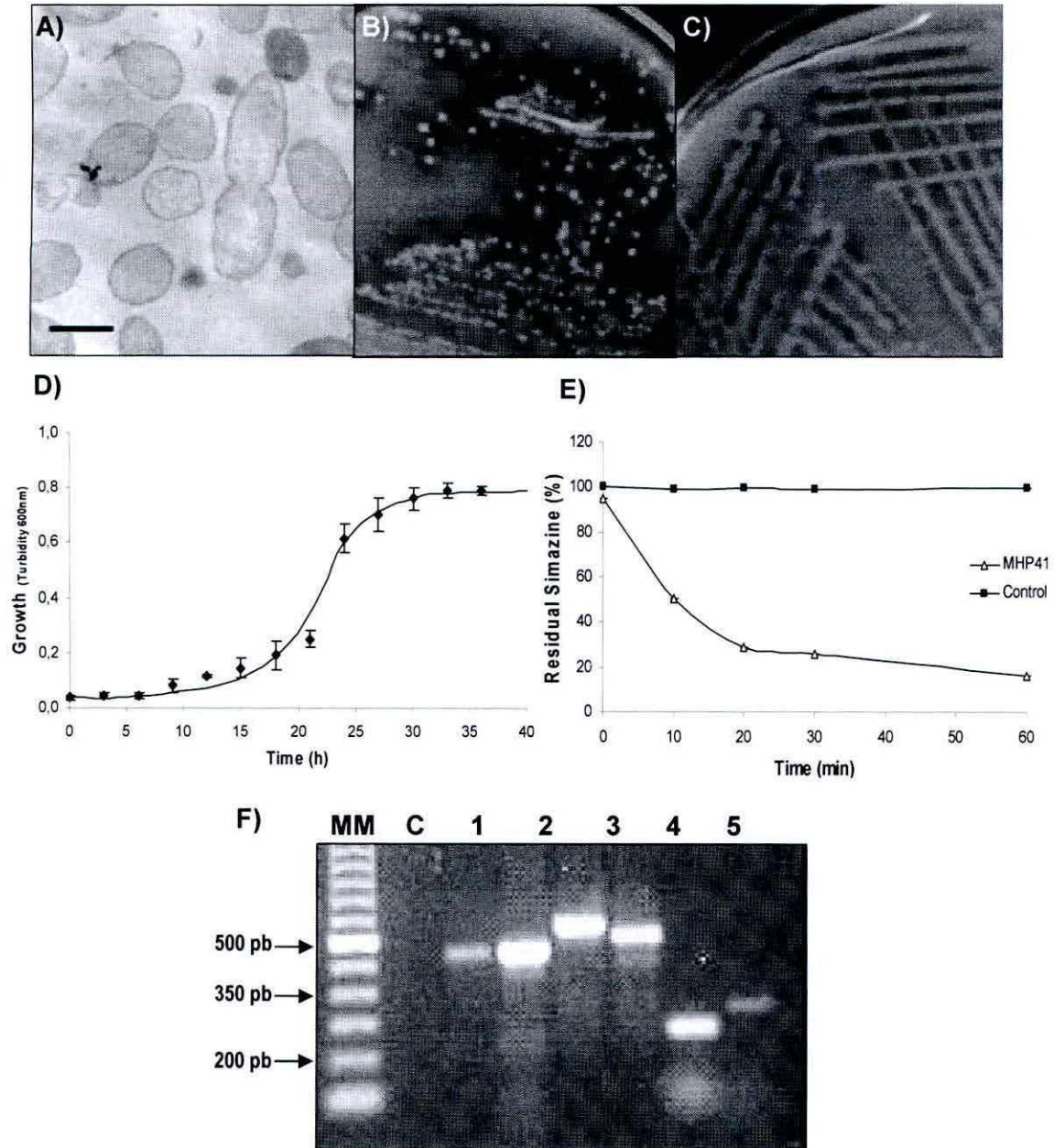


Figura 6. Caracterización de la bacteria degradadora de s-triazinas *Pseudomonas* sp. MHP41. A) Microscopía electrónica. B y C) Colonias de la cepa MHP41 creciendo en medio mínimo con simazina como única fuente de nitrógeno. Se observa el halo de degradación de simazina (zona de transparencia alrededor de la colonia). D y E) Curvas de crecimiento y degradación de simazina, respectivamente. F) Genes catabólicos de la vía de degradación de s-triazinas. Líneas 1 a 6 representan los genes *atz* A-F, respectivamente. MM: marcador molecular y C: control negativo de PCR (Adaptado de Hernández *et al.*, 2008c).

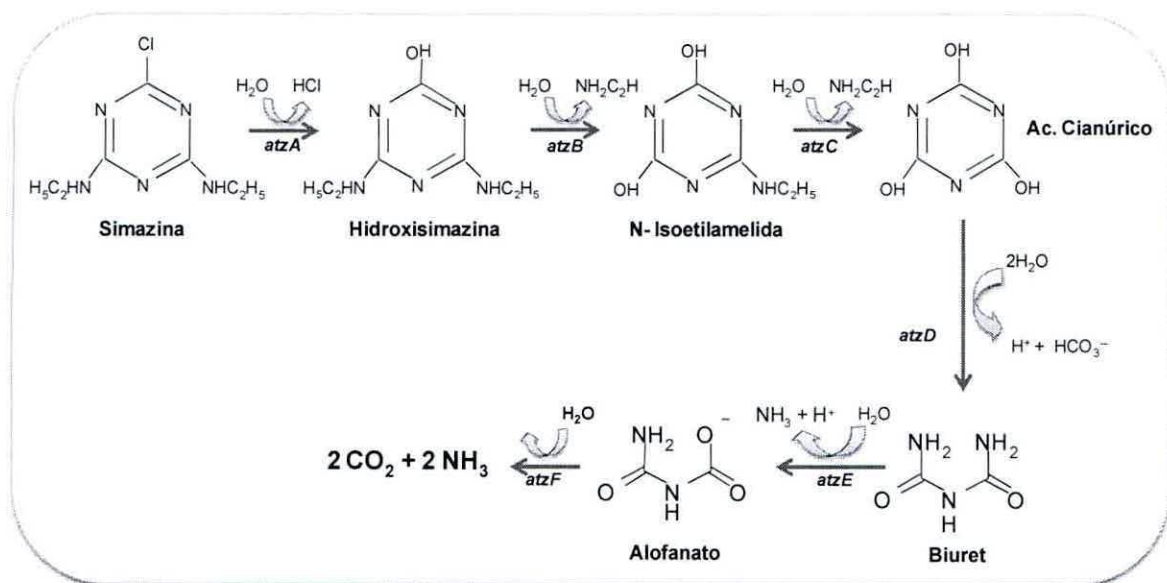


Figura 7. Vía catabólica de simazina. Simazina es degradada hasta ácido cianúrico por las enzimas de la vía superior de simazina: clorhidrolasa, hidroxiatrazina etilaminohidrolasa y N-isopropilamida-isopropilamino hidrolasa codificadas por los genes *atzA*, *atzB* y *atzC* respectivamente. En la vía inferior el ácido cianúrico es mineralizado por acción de las enzimas ácido cianúrico amidohidrolasa, biuret hidrolasa y alofanato hidrolasa, codificadas por los genes *atzD*, *atzE* y *atzF*, respectivamente.

3. Biorremediación

La legislación y la tecnología orientada a la limpieza del ambiente y la prevención de su deterioro han sido dos de los mayores avances de finales del siglo XX y han propiciado el nacimiento de la tecnología de la biorremediación. Dicha técnica se basa en la existencia de microorganismos cuyo metabolismo es capaz de transformar compuestos xenobióticos en productos no tóxicos, los cuales pueden integrarse en los ciclos biogeoquímicos naturales. El éxito de la técnica depende de la existencia, en el lugar contaminado, de microorganismos con las capacidades metabólicas apropiadas, concentraciones adecuadas de oxígeno y nutrientes, así como de las características físico-químicas del compuesto a degradar.

A mediados del siglo XX se desarrollaron las primeras investigaciones encaminadas a estudiar el potencial de los microorganismos para biodegradar contaminantes (Zobell, 1946;

Davis, 1956). Este “empleo” intencionado de microorganismos recibió entonces el nombre de biorremediación. Las primeras técnicas se aplicaron en los años 70 y sus actores principales fueron compañías petrolíferas quienes, por entonces, originaron las más grandes catástrofes ambientales por vertido de petróleos. Desde esa fecha a la actualidad las estrategias de biorremediación han ido perfeccionándose gracias a la labor conjunta e interdisciplinaria desarrollada por investigadores de diferentes áreas (ingeniería, microbiología, bioquímica) a favor del medio ambiente.

Las tecnologías que se enmarcan dentro de los procesos de biorremediación se pueden clasificar como *ex situ* e *in situ* (Boopathy, 2000). Las tecnologías denominadas *ex situ* son aquellos tratamientos que involucran la remoción física del material contaminado para su posterior tratamiento. La selección de la tecnología *ex situ* se basa en la naturaleza del contaminante a remediar, el nivel de recuperación requerido y los costos asociados, incluyendo el costo de transporte al lugar de operaciones. Entre las técnicas de biorremediación *ex situ* se destacan biopilas, compostaje en hileras y el tratamiento sobre el terreno.

Los tratamientos que se realizan en el sitio contaminado se denominan tecnologías *in situ*. Frecuentemente se recomienda como alternativa de tratamiento las técnicas de remediación *in situ*, ya que minimizan el impacto en el sitio contaminado (Erickson *et al.*, 1992). Algunos ejemplos tecnologías *in situ* son: compostaje, biorreactores, bioventing, biofiltros, bioaumentación y bioestimulación (Lagrega *et al.*, 1998, Philp *et al.*, 2005). Las ventajas de la biorremediación *in situ* están dadas porque la intervención del sitio a remediar es mínima frente a las tecnologías *ex situ* (Philp *et al.*, 2005).

La biorremediación es una herramienta que puede ser utilizada eficazmente en diversos ambientes contaminados específicos (agua, suelo, lagunas, sedimentos o residuos industriales). Cuando es aplicable, la biorremediación suele ser un medio rentable para restablecer la calidad del medio ambiente. En la Tabla 3 se muestran algunos cálculos económicos realizados por autores de reconocido prestigio en el campo de la biorremediación de hidrocarburos (Atlas y Unterman, 1999).

Tabla 3. Beneficios económicos de la biorremediación en casos reales. Los costos (\$) se indican en dólares americanos. Fuente: Atlas & Unterman, 1999.

Aplicación	Tratamiento físico y/o químico	Biorremediación	Diferencia (beneficio)
Suelo contaminado por hidrocarburos (" <i>brownfield</i> " urbano)	Excavación y transporte a vertedero. Coste: \$3 millones	"Bioventing on site": \$0,2 millones	\$2,8 millones
Acuífero contaminado por un vertido de gasolina desde un tanque enterrado	Bombeo, tratamiento de " <i>air stripping</i> " y " <i>skimming</i> ". Coste: \$2 millones	'Soil vapor extraction' y 'bioventing'. \$0,25 millones.	\$1,75 millones
Contaminación múltiple (" <i>superfund site</i> ")	Encapsulamiento. Coste: \$25 millones	Biorremediación 'in situ'. \$5 millones.	\$20 millones
Contaminación múltiple con BTEX y Arsénico (" <i>superfund site</i> ")	Bombeo y tratamiento. Encapsulamiento. Coste: \$50 millones	Bioestimulación 'in situ', bioventing y air sparging. Inmovilización biológica de metales. \$2 millones.	\$48 millones
Vertido de crudo en el mar.	Lavado físico, coste de \$1,1 millones por kilómetro de costa afectado.	Bioestimulación con fertilizante: \$0,005 millones por kilómetro de costa afectado	Más de \$1 millón por km de costa

3.1. Factores que afectan la biorremediación

A pesar de la relativamente larga historia de la investigación en el campo de la biorremediación, ésta continúa siendo una disciplina esencialmente empírica, en la cual muchos de los factores biológicos que controlan los procesos no se comprenden adecuadamente.

La capacidad de los microorganismos de degradar compuestos depende de numerosos factores, entre los que se incluyen la estructura química, la concentración y la biodisponibilidad del contaminante, el tamaño y tipo de las comunidades microbianas (Vogel

et al., 2002). Entre los factores medioambientales se encuentran la humedad, el pH, la temperatura, el contenido de carbono y de nitrógeno, la textura del suelo y el potencial redox (Tabla 4) (Boopathy, 2002).

Tabla 4. Principales factores que afectan la biorremediación. Adaptada de Boopathy, 2002.

Microbiológicos	Generación de biomasa necesaria Mutaciones o transferencia horizontal de genes Inducción enzimática Producción de metabolitos tóxicos
Ambientales	Deficiencia de nutrientes Condiciones ambientales inhibitorias Presencia de sustratos alternativos
Sustrato (contaminante)	Concentración Estructura química Toxicidad Solubilidad
Biodisponibilidad físicoquímica del contaminante	Adsorción de equilibrio Adsorción Irreversible Incorporación en la materia húmica
Limitaciones a la transferencia de masa	Difusión de Oxígeno y Solubilidad Difusión de nutrientes Solubilidad/Miscibilidad en agua

3.2. Estrategias de biorremediación *in situ*: bioaumentación

La bioaumentación es una técnica de biorremediación que consiste en la inoculación directa al sitio de contaminación de cepas específicas o consorcios de microorganismos al suelo contaminado, de manera de incrementar la capacidad degradadora del sistema (Vogel, 1996). En general, es utilizada para compuestos recalcitrantes y cuando la microbiota nativa no posee la capacidad para degradar los contaminantes (Philp *et al.*, 2005). Existen tres alternativas en el desarrollo de técnicas de bioaumentación:

- a) Aumentar la diversidad genética mediante la inoculación de microorganismos no autóctonos, con lo que se busca incrementar el potencial catabólico y, en consecuencia, aumentar la tasa de degradación del contaminante.
- b) Extraer muestras del sitio contaminado y utilizar estas muestras como inóculo inicial para enriquecimientos sucesivos con el contaminante, con lo que se incrementa la población de microorganismos degradadores. Luego, el inóculo es aplicado al sitio a remediar, logrando aumentar la tasa de biodegradación. En este procedimiento no se incrementa la diversidad genética del sitio. La cepa utilizada como inóculo, en general, posee una elevada capacidad de degradación y alta velocidad de crecimiento.
- c) Adicionar consorcios sin caracterizar, presentes en lodos de aguas residuales y en material de compost. Esta una alternativa utilizada en la práctica por compañías que deben remediar sitios, pero no se encuentran vinculados con tecnologías de biorremediación.

Se han descrito numerosas situaciones en las que la bioaumentación ha funcionado, en suelos, lodos y aguas subterráneas contaminadas (Tabla 5). Sin embargo, es necesario en cada caso particular estudiar la necesidad o no de aplicar inóculos exógenos, así como sus condiciones óptimas de aplicación (Vogel, 1996). Como puede observarse en la Tabla 5 se mencionan algunos ejemplos exitosos donde inóculos exógenos fueron utilizados en procesos de bioaumentación.

Tabla 5. Estudios exitosos de biorremediación de lodos y suelos contaminados mediante la utilización de inóculos bacterianos (bioaumentación).

Inóculo Exógeno	Contaminante (matriz)	Referencia
<i>Pseudomonas</i> sp. P51	1,2,4-triclorobenceno (suelo)	(Tchelet <i>et al.</i> , 1999)
<i>Alcaligenes eutrophus</i> TCP	2,4,6-triclorofenol (suelo)	(Andreoni <i>et al.</i> , 1998)
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	2,4-ácido diclorofenoxiacético (suelo)	(Daane y Häggblom, 1999)
<i>Comamonas testosteroni</i> I2	3-cloroanilina (lodos)	(Boon <i>et al.</i> , 2000)
<i>Comamonas testosteroni</i> BR60	3-clorobenzoato (suelo)	(Gentry <i>et al.</i> , 2001)
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	atrazina (suelo)	(Shapir y Mandelbaum, 1997)
Consortio	atrazina (suelo)	(Alvey y Crowley, 1996)
Consortio	atrazina (suelo)	(Grigg <i>et al.</i> , 1997)
Consortio	atrazina (suelo)	(Newcombe y Crowley 1999)
<i>Agrobacterium radiobacter</i> J14a	atrazina (suelo)	(Struthers <i>et al.</i> , 1998)
<i>Escherichia coli</i> (pAtzA)	atrazina (suelo)	(Strong <i>et al.</i> , 2000)
<i>Arthrobacter</i> sp B1B	policlorobifenilo (PCB) (suelo)	(Singer <i>et al.</i> , 2000)
Consortio	crudo de petróleo (lodos)	(Mishra <i>et al.</i> , 2001)
Consortio	HAPs (lodos)	(Cardinal y Stenstrom, 1991)
<i>Arthrobacter</i> sp. RP17	HAPs (suelo)	(Singer <i>et al.</i> , 2000)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> EPA505	HAPs (suelo)	(Straube <i>et al.</i> , 1999)
Suelo activado	pentaclorofenol (suelo)	(Barbeau <i>et al.</i> , 1997)
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1	pentaclorofenol (suelo)	(Beudet <i>et al.</i> , 1998)
<i>Pseudomonas</i> sp. MHP41	simazina (suelo)	esta tesis

3.3. Aproximación experimental de la biorremediación: estudios a escala de microcosmos y campo

Los microcosmos utilizados en los experimentos de laboratorio son modelos miniaturizados con múltiples componentes, que permiten comprender las relaciones que se establecen entre las poblaciones microbianas, así como la función de éstas en el ecosistema cuando tiene lugar un episodio de contaminación. Estos sistemas, además de los resultados cualitativos, permiten obtener resultados cuantitativos respecto al comportamiento del contaminante en el medio.

Un aspecto clave a la hora de considerar si los datos obtenidos a partir del modelo experimental pueden extrapolarse a un suceso real, es el grado de fidelidad con el que cada modelo experimental reproduce el ecosistema original. Es importante incluir controles apropiados para separar la biodegradación de otros procesos abióticos que pudieran controlar o limitar la desaparición del contaminante. En este sentido, para demostrar la utilidad potencial de una técnica de biorremediación, un aspecto importante es documentar la degradación del contaminante en condiciones controladas de laboratorio.

Los parámetros comúnmente analizados para evaluar la respuesta de los microorganismos frente a un contaminante son los recuentos de microorganismos, ya sea mediante la técnica del número más probable (MPN), mediante microscopía de fluorescencia o a través del recuento de microorganismos degradadores del compuesto capaces de crecer en placas de medio selectivo, la medición de la respiración microbiana (consumo de oxígeno o producción de dióxido de carbono) y la determinación de la velocidad de degradación en comparación con los controles no tratados. Estas técnicas, a excepción de los recuentos directos al microscopio, están limitadas por los problemas asociados a los microorganismos no cultivables, haciéndolas inadecuadas para evaluar la estructura de la comunidad de los ambientes afectados. Por lo tanto, la realización de un estudio fiable requiere el uso de métodos de biología molecular.

La información obtenida durante los ensayos de microcosmos, es necesaria para evaluar, los factores ambientales que pudieran condicionar la biodegradación microbiana de los contaminantes en el suelo y decidir si es factible la aplicación de la biorremediación. Finalmente, si los resultados son favorables, se puede pasar a una siguiente fase experimental a escala de campo donde es posible estudiar los efectos reales de los distintos parámetros ambientales sobre la biodegradación de contaminantes orgánicos en suelos.

4. Ecología microbiana: microorganismos en la biosfera

Aunque todos los organismos vivos contribuyen a la vida, los microorganismos desempeñan un papel particularmente importante. Los microorganismos son los seres más

numerosos que existen en la tierra; son organismos ancestrales que han colonizado exitosamente diversos nichos ecológicos. Además, su presencia y actividad es esencial para la salud y funcionamiento adecuado de todos los ecosistemas.

En los últimos años, se ha podido estimar con suficiente fiabilidad el número total de procariotas que existen en nuestro planeta. Whitman *et al.*, (1998) lo sitúan en unos cinco quintillones ($4-6 \times 10^{30}$) de células procariotas. En estos cálculos se considera que sólo el 10% de ésta se desarrolla en la biosfera superficial (aguas, sedimentos, aire, suelos), que es la que más se ha investigado. Sorprendentemente, esta abundancia de microorganismos terrestres conformaría aproximadamente el 50% de la biomasa protoplasmática viva del planeta, constituyendo el principal componente de la biomasa de la Tierra (Pedersen, 2000; Whitman *et al.*, 1998).

La capacidad de los microorganismos para desarrollar tal relevancia en el planeta se debe a su gran versatilidad bioquímica, basada en la posibilidad de llevar a cabo una enorme cantidad de tipos de reacciones: oxidaciones, reducciones, etc. sobre los elementos componentes de lo que llamamos vida, y que de manera directa o indirecta gobiernan todos los procesos en la tierra (Atlas y Bartha, 1997; Díaz, 2004).

4.1. El suelo como hábitat para los microorganismos: "la caja negra"

Llamamos suelo a la parte más externa de la corteza terrestre. Es un sistema de interacción entre tres fases bien definidas: una fase sólida, constituida por materia mineral y orgánica, una fase líquida, y una fase gaseosa o atmósfera del suelo. Este sistema complejo que constituye el suelo, característicamente heterogéneo espacial y temporalmente, alberga una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas (Fig. 8). El suelo es un ambiente muy apropiado para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos, protozoos) como procariotas (bacterias y arqueas) (Nogales, 2005). La abundancia de procariotas estimada en el suelo se describe en la Tabla 6 (Whitman *et al.*, 1998). Todos estos organismos establecen relaciones entre ellos en formas muy variadas y complejas y también contribuyen a las características propias del suelo ya que desempeñan funciones de

gran importancia en relación con los ciclos biogeoquímicos; fertilidad de las plantas y protección frente a patógenos; degradación de compuestos xenobióticos, etc.

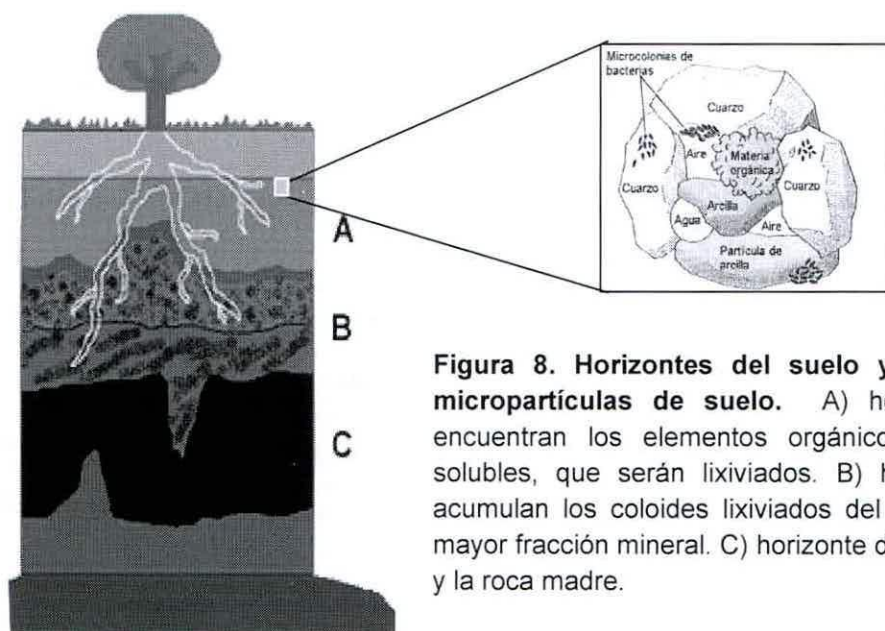


Figura 8. Horizontes del suelo y composición de las micropartículas de suelo. A) horizonte en el que se encuentran los elementos orgánicos, finos o gruesos, y solubles, que serán lixiviados. B) horizonte en el que se acumulan los coloides lixiviados del horizonte A. Tiene una mayor fracción mineral. C) horizonte de contacto entre el suelo y la roca madre.

Tabla 6. Abundancia de especies de *Bacteria* y *Archaea* en diferentes ecosistemas de suelo.
Fuente: Whitman *et al.*, 1998.

Tipo de ecosistema	Area ($\times 10^{12} \text{ m}^2$)	N° cel ($\times 10^{27}$)
Selva tropical lluviosa	17.0	1.0
Selva tropical pluviestacional	7.5	0.5
Bosque templado esclerófilo	5.0	0.3
Bosque templado caducifolio	7.0	0.4
Bosque boreal (taiga)	12.0	0.6
Bosques y arbustedas	8.0	28.1
Sabana	15.0	52.7
Praderas templadas	9.0	31.6
Matorral desértico	18.0	63.2
Tierras cultivadas	14.0	49.1
Tundra y vegetación alpina	8.0	20.8
Pantanos y zonas húmedas	2.0	7.3
Total	123.0	255.6 $\times 10^{27}$

La complejidad del suelo como ecosistema junto con las especiales particularidades de los microorganismos, tales como su tamaño microscópico y las dificultades para una diferenciación basada en su morfología, habían proporcionado una visión del mundo microbiano edáfico como una "caja negra" de la cual se sabía que cumplía una función aunque no se conociese su contenido (Insam, 2001). Históricamente, debido a la falta de métodos adecuados, la complejidad de las comunidades microbianas o "caja negra" se analizaba empleando metodologías que aproximaban la actividad y abundancia microbiana y el intercambio de flujos entre la atmósfera y el suelo (procesos como respiración, desnitrificación, nitrificación, fijación denitrógeno, etc.) De esta manera, el conocimiento de los microorganismos del suelo quedaba limitado a aquellos pocos que podían cultivarse en el laboratorio. De esta manera, importantes preguntas quedaban por resolver en cuanto a la composición y estructura de las comunidades microbianas edáficas, los cambios que se producen en dichas comunidades en respuesta a diferentes factores ambientales y/o perturbaciones.

4.2. Mundo microbiano del suelo: la apertura de "la caja negra"

La comparación de recuentos microscópicos directos de células con los obtenidos en placas de cultivo puso de manifiesto que al menos el 99% de los procariotas presentes en el suelo son incapaces de crecer en medios de cultivo (Torsvik, *et al.*, 1990; Truper, 1992). Por lo tanto, la mayor parte de la diversidad procariota que integraba la caja negra del suelo quedaba fuera del alcance de los métodos de estudio tradicionales,

A partir de la década de los ochenta, se incorporaron novedosas y potentes diferentes técnicas de estudio para caracterizar a las comunidades microbianas que no requieren del cultivo previo de los microorganismos (Insam, 2001; Kirk, *et al.*, 2004). En general estas técnicas se basan en el análisis de marcadores moleculares como ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA) y ácidos nucleicos (DNA y RNA). Ambos tipos de marcadores se encuentran presentes en todas las células, se pueden extraer directamente de muestras de suelo sin necesidad de realizar cultivos previos y además permiten diferenciar distintos grupos de microorganismos. Utilizando estos marcadores no sólo se puede determinar la composición de las comunidades microbianas sino que también se puede cuantificar la abundancia de microorganismos específicos.

4.2.1. Técnicas moleculares basadas en ácidos nucleicos: el RNA ribosomal para análisis de la composición de comunidades microbianas de suelos.

Entre los microorganismos, la diversidad filogenética y bioquímica es tal, que establecer su identificación y sus relaciones filogenéticas no es una tarea sencilla. El uso de métodos modernos de análisis molecular ha demostrado ser las herramientas de análisis más adecuadas (Amann *et al.*, 1995; Head *et al.*, 1998).

De entre todas las moléculas celulares estudiadas, los ácidos nucleicos son las moléculas más útiles, puesto que han contribuido con una nueva perspectiva al entendimiento de la estructura de las comunidades microbianas. Una de las principales ventajas asociadas a los métodos con ácidos nucleicos es que puede analizarse a la comunidad microbiana en su totalidad, incluyendo aquellos organismos que no han podido ser cultivados en el laboratorio.

La descripción de los microorganismos presentes en muestras de suelo experimentó un gran avance gracias a la utilización de la información que proporcionan los genes que codifican para RNA ribosomal (rRNA), y en particular el gen que codifica para la subunidad menor del ribosoma bacteriano, 16S rRNA.

Hay varias razones explícitas y una serie de ventajas que justifican el uso de este marcador molecular (rRNA):

- a) está presente en todos los organismos y tiene la misma función en todos ellos
- b) el rRNA constituye un componente importante de la masa celular y, en general, recuperado fácilmente de todos los tipos de organismos.
- c) las moléculas de rRNAs son antiguas y muy conservadas en su estructura global. Así, formas homólogas de rRNAs son fácilmente identificados por su tamaño.
- d) debido a restricciones estructurales, diferentes regiones de la molécula presentan distinto grado de variabilidad en secuencia, lo que permite realizar comparaciones con diferente nivel de resolución
- e) su transmisión es principalmente vertical ya que se considera que no está sujeto a transferencia génica horizontal entre microorganismos. Por lo tanto, las relaciones

establecidas por las comparaciones de secuencias de rRNA representan verdaderas relaciones evolutivas

- f) la longitud de su secuencia tiene un tamaño adecuado como para proporcionar suficiente información y comparaciones estadísticamente significativas
- g) el análisis de la secuencia nos permite realizar reconstrucciones filogenéticas de los microorganismos.

4.2.2. Ecología microbiana molecular: dos enfoques para conocer a la diversidad natural del suelo

Una vez extraído y amplificado el gen 16S rRNA por PCR es posible analizar su diversidad en la comunidad siguiendo diferentes estrategias moleculares. La utilización combinada de dichas técnicas moleculares ha permitido un estudio en profundidad de la diversidad, estructura y dinámica de comunidades microbianas en general y del suelo en particular.

La ecología microbiana molecular tiene dos enfoques generales: la identificación de las especies presentes en un medio ambiente, y el análisis de sus poblaciones en el medio ambiente (Fig. 9). Según ambos enfoques, la Figura 9 describe los métodos moleculares dependientes del gen ribosomal (rRNA) empleados en ecología microbiana molecular para la descripción de la diversidad en una muestra ambiental (Head *et al.*, 1998). En el primer caso, organismos de un medio ambiente son estudiados utilizando métodos similares al análisis de cultivo de especies. Este enfoque empieza con una muestra del medio ambiente cultivada en el laboratorio y termina con la obtención de secuencias y el análisis filogenético de los datos. En el segundo enfoque, los organismos se estudian directamente en el microambiente utilizando secuencias de rRNA para determinar el número y la dinámica de la población, y distinguir una especie o grupo filogenético de los demás. En este caso, el enfoque comienza con la obtención de secuencias y la información filogenética y culmina con la aplicación de los datos obtenidos sobre el medio ambiente, es decir, a la inversa del caso anterior. Según ambos enfoques, algunas de las estrategias que se pueden emplear para el estudio de las comunidades microbianas en el ambiente son las siguientes:

- a) identificación de los principales grupos microbianos en una muestra ambiental mediante la obtención de secuencias de los diferentes grupos filogenéticos. De esta manera se puede evaluar su abundancia en el ecosistema
- b) utilización de la oligonucleótidos de rRNA marcadas con fluorocromos para ser empleadas como sondas en la identificación y cuantificación de microorganismos o grupos de microorganismos específicos en muestras ambientales mediante técnicas de por toda la hibridación de células intactas
- c) cultivo de microorganismos mediante métodos de enriquecimiento con el objeto de aislar organismos previamente identificados por su secuencias de rRNA

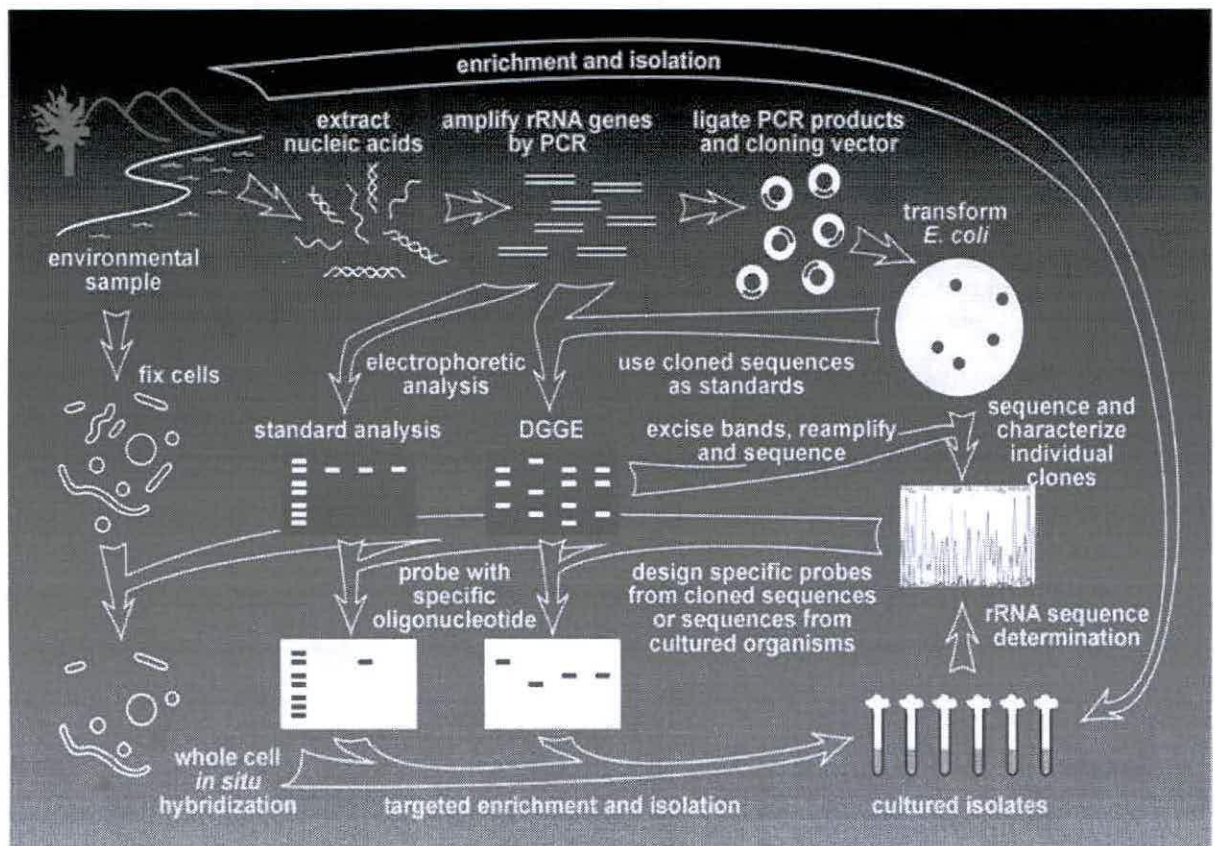


Figura 9. Descripción del ciclo completo del rRNA para el estudio de la diversidad microbiana natural del medio ambiente. Fuente: Head *et al.*, 1998.

4.3. La dinámica y estructura de las poblaciones durante estrategias de biorremediación

La comunidad bacteriana del suelo actúa como una entidad funcional y dinámica, combinando cada una de las capacidades metabólicas de las especies bacterianas que la conforman (Schmidt *et al.*, 1989, 1990). Cuando un compuesto químico entra al suelo su mineralización es posible sólo si la microbiota del suelo presenta la ruta completa de degradación correspondiente. Estudios en ecología microbiana han demostrado que la vía de biodegradación de los herbicidas clorados está restringida a una pequeña fracción de microorganismos de suelo y que el tamaño de la comunidad degradadora limita dicha tasa de degradación (Soulas and Lagacherie, 2001).

Los cambios en la composición de las comunidades microbianas del suelo ocasionados por los impactos producidos por compuestos xenobióticos han sido estudiados (Soulas and Lagacherie, 2001; Ostrofsky *et al.*, 2002). No obstante, la mayor parte de las investigaciones se basan en el estudio de la degradación del compuesto tóxico. Las variaciones que la microbiota del suelo pueda sufrir respecto a su estructura, viabilidad y actividad biológica, aún son interrogantes.

Existe una variedad de investigaciones que aplican técnicas de ecología microbiana molecular para el análisis de la diversidad microbiana en suelos contaminados con diversos compuestos xenobióticos. Muller y colaboradores (2001) estudiaron el impacto de la contaminación por mercurio sobre la diversidad de la microbiota de tres suelos con diferente grado de exposición a dicho metal. Se estudiaron también, cambios en la composición de la microbiota de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos durante ensayos de fito-remediación (Siciliano *et al.*, 2003). Dejonghe *et al.*, (2000) evaluaron el efecto producido sobre la degradación herbicida 2,4 D (ácido 2,4-diclorofenoxyacético) y la estructura de la comunidad del suelo cuando la cepa *Pseudomonas putida* UWC3 fue introducida en dos horizontes de profundidad en suelos expuestos y no expuestos a dicho herbicida. Este trabajo, demostró que la bioaumentación provoca cambios en la composición de las comunidades del suelo resultando ser una estrategia de biorremediación efectiva incluso para aquellos suelos que tengan una baja actividad microbiana (como lo son suelos de horizontes más profundos). Boon *et al.*, (2003) establecieron mediante análisis de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) y FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) que la

bioaumentación con bacterias degradadoras de compuestos orgánicos clorados de bioreactores, utilizados en la remoción de xenobióticos clorados, acelera la degradación de dichos tóxicos y ejerce un efecto protector sobre las comunidades bacterianas nitrificantes.

En este contexto, el uso de herramientas moleculares favorece el estudio de la estructura y función de la comunidad microbiana de suelos expuestos a s-triazinas, permitiendo conocer la respuesta de dicha comunidad frente a diferentes impactos ecológicos como lo son la aplicación de herbicidas clorados y estrategias de bioaumentación.

HIPÓTESIS Y PLAN DE TRABAJO

II. HIPOTESIS

La complejidad del suelo como ecosistema y las capacidades de los microorganismos para llevar a cabo los procesos de remoción de xenobióticos llevan a plantear las siguientes hipótesis de trabajo:

- 1- “La bioaumentación con la bacteria nativa degradadora de s-triazinas *Pseudomonas* sp. MHP41, incrementa la degradación de simazina en suelos agrícolas contaminados potenciando los procesos naturales de remoción del herbicida.”
- 2- “Las comunidades microbianas de suelos agrícolas de la región de Valparaíso experimentan variaciones en su estructura en respuesta a estrategias de biorremediación y por exposición al herbicida simazina.”

III. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la bioaumentación con la cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. MHP41 sobre procesos de degradación de simazina en suelos agrícolas a escala microcosmos y de campo y sobre la estructura de las comunidades microbianas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterizar el potencial de degradación de simazina de células inmovilizadas de *Pseudomonas* sp. MHP41 bajo condiciones controladas de laboratorio.

2. Determinar el efecto de la bioaumentación con la bacteria *Pseudomonas* sp. MHP41 sobre la atenuación del compuesto simazina en suelos agrícolas, mediante experimentos de biorremediación a escala de microcosmos.
3. Caracterizar la estructura de comunidades microbianas de suelos agrícolas y estudiar su dinámica en respuesta al proceso de bioaumentación con la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 y a la aplicación de simazina, mediante técnicas moleculares cultivo-independiente.
4. Estudiar el efecto de la bioaumentación con la bacteria *Pseudomonas* sp. MHP41 sobre la atenuación de simazina en suelo agrícola contaminado bajo condiciones de campo.

IV. PLAN DE TRABAJO

Para abordar el objetivo general de esta tesis se hizo necesario diseñar un sistema modelo de estudio que permitiese evaluar las capacidades de la cepa bacteriana como biocatalizador de simazina y su aplicación biotecnológica.

En este contexto se propuso la bioaumentación como estrategia de biorremediación de suelos, por ser una tecnología natural, limpia y promisorio desde el punto de vista ambiental y económico.

Como sistema modelo para estudiar la bioaumentación se diseñaron microcosmos de suelos. El sistema de microcosmos, es una aproximación intermedia entre el laboratorio y la situación real a campo. Su implementación durante estudios biotecnológicos es fundamental dado que aportan mayor complejidad al sistema de estudio bajo algunas condiciones aún controladas. Cabe destacar que el suelo que se seleccionó para los experimentos de biorremediación en microcosmos representa a los ecosistemas agrícolas. Los suelos seleccionados diferían principalmente, en el historial de aplicación del herbicida simazina.

Como primer desafío se propuso proteger el biocatalizador *Pseudomonas* sp. MHP41. La bacteria MHP41 es una cepa degradadora de compuestos s-triazinas, nativa de suelos agrícolas con historial de aplicación de simazina de la región de Valparaíso. Se evaluó su capacidad degradadora bajo procesos de inmovilización en matriz de alginato, en cultivos puros y en suelos contaminados con simazina.

Durante los experimentos de bioaumentación, la principal variable de estudio fue la inoculación de la cepa MHP41. Además, se estudió el efecto sobre la atenuación de simazina, de otras variables como la dosis de aplicación de simazina, el rol de la microbiota nativa y de plantas.

La efectividad de la bioaumentación se estudió mediante métodos analíticos, microbiológicos y moleculares. Se determinó la disminución de la concentración del compuesto durante el proceso de biorremediación y la eficiencia de la bioaumentación en relación a la atenuación natural observada. Asimismo, se comparó la actividad catabólica nativa de cada suelo respecto de la observada en los suelos bioaumentados con la cepa MHP41. También se describió la estructura y diversidad de las comunidades microbianas del suelo y sus variaciones en respuesta a la aplicación de simazina y la adición directa al suelo del agente biocatalizador.

Por otra parte, para estudiar el efecto de la biorremediación en condiciones naturales, se diseñó un experimento a escala de campo. En este aspecto, la bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 se realizó bajo condiciones ambientales de campo.

Por consiguiente, para la realización de esta tesis se consideró el desarrollo de diversas actividades y la implementación de metodologías de gran complejidad cuyos resultados y discusión son presentados a continuación.

MATERIALES Y MÉTODOS

V. MATERIALES Y METODOS

1. Reactivos

Para suplementar medios de cultivo, se empleó el herbicida simazina de 99% pureza (Atanor, Buenos Aires, Argentina). Las curvas de calibración para la cuantificación por HPLC se realizaron con un estándar de simazina con una pureza >99% (Dr. Ehrenstorfer-Schäfer, Augsburg, Alemania).

Para la contaminación controlada del suelo, se empleó simazina comercial, Gesatop 90 WG[®], 90% ingrediente activo (Syngenta Crop Protection Inc., Greensboro, U.S.A) importada y distribuida en Chile por Syngenta Agribusiness S.A.

Los materiales utilizados en biología molecular para el estudio de la estructura y dinámica de las comunidades bacterianas, se encuentran detallados en la metodología según corresponda.

2. Cepas bacterianas

Pseudomonas sp. MHP41 es una bacteria que se aisló de un suelo de cultivo de palto, en la provincia de Quillota, Región de Valparaíso. Este suelo tiene un historial de aplicación de simazina de más de 20 años (Hernández *et al.*, 2008b, 2008c). *Pseudomonas* sp. MHP41 posee los genes que codifican las enzimas de las vías de degradación y mineralización de compuestos del tipo s-triazinas, codificadas por los genes *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE* y *atzF* (Hernández *et al.*, 2008c) (véase Figura 6).

Otra cepa bacteriana empleada en esta tesis es *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum *et al.*, 1995). Esta es una bacteria modelo para la degradación de compuestos s-triazinas y en ella se ha descrito un plásmido catabólico (pADP-1) que codifica todos los genes *atz* asociados a la ruta catabólica superior (*atz ABC*) e inferior

(atz DEF) de estos compuestos (Martínez *et al.*, 2001; De Souza *et al.*, 1998; Strong *et al.*, 2002) (véase Figura 5).

3. Medios y condiciones de cultivo

Pseudomonas sp. MHP41 y *Pseudomonas* sp. ADP se crecieron en medio mínimo (MM) suplementados con simazina como única fuente de nitrógeno (García-González *et al.*, 2003). 100 mL de MM contienen: 10 mL de tampón fosfato 10x; 2,5 mL de solución stock de succinato 1M; 200 µL de solución de microelementos 500x.

- 1 L de solución tampón fosfato 1x contiene: 70 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 28 g de KH_2PO_4 ; 5 g de NaCl.
- 100 mL de solución de microelementos 500x contiene: 5 g de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,5 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,25 g $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 0,32 g ZnCl_2 ; 0,033 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,018 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$; 0,015 g $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,325 g H_3BO_3 ; 0,5 g EDTA; 7,3 mL de HCl 37%.

Para MM líquidos la concentración de simazina fue 0,5 mM, mientras que para MM sólidos (suplementados con agar 1,5% p/v) simazina se adicionó a una concentración 2,5 mM. Alternativamente, se empleó medio agar tripticasa soya (TSA, Oxoid) suplementados con simazina (3,5 mM).

3.1. Conservación de cepas

Con el fin de preservar las cepas en este trabajo se han utilizado dos técnicas para su conservación.

Las cepas MHP41 y ADP cultivadas hasta fase exponencial de crecimiento se almacenó en viales con glicerol al 20% v/v, a -20 °C o a -70 °C; para su conservación por meses.

Las cepas bacterianas se guardaron habitualmente en forma de cultivo puro en las placas con los medios sólidos o en medios líquidos mencionados anteriormente (MM-Sz y TSA suplementado con simazina). El uso de este método está limitado por el desecado de las placas o envejecimiento del cultivo. En el caso de almacenamiento de placas crecidas con la cepa, el mismo se efectuó por un período nunca superior a 30 d a 4 °C. El almacenamiento de cultivos líquidos se efectuó por un período máximo de 10 d a 4 °C.

3.2. Crecimiento bacteriano

3.2.1. Preparación de preinóculos

Se tomó 10 µl desde vial de conservación de la cepa y se plaqueó en medio MM con simazina 2,5 mM o medio TSA suplementado con simazina (3,5 mM). Las placas se incubaron durante 5 o 6 d a 28 °C. Al cabo de este tiempo, se observó la formación del halo de degradación (zona de transparencia alrededor de la colonia). Se tomó una colonia crecida en estas condiciones y se inoculó en tubos con 3 mL de MM con simazina como única fuente de nitrógeno (0,5 mM). Los tubos se incubaron a 28 °C con agitación (180 rpm) durante 3 d. El crecimiento de la cepa se determinó por medición de turbidez a 600 nm en espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS, Spectrometer Lambda 11. La viabilidad celular se determinó mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹) en medio TSA. La cepa MHP41 crecida hasta fase de crecimiento exponencial a una turbidez_{600nm} ~0.8 presenta 1,52 x 10⁸ UFC mL⁻¹ (Miralles, 2007; Hernández *et al.*, 2008c).

3.2.2. Preparación del cultivo

Para la preparación de cultivos líquidos, una alícuota del preinóculo (2% v/v) se inoculó en medio MM con simazina 2,5 mM e incubó a 28 °C en agitación (180 rpm) hasta alcanzar fase exponencial (4 ó 5 d). Para cultivos por lote se utilizó matraces de vidrio aforados de 125 mL con 30 mL de MM con simazina 2,5 mM. Para obtener mayor

biomasa, el crecimiento de la cepa MHP41 en cultivos por lote (400-600 mL) se optimizó empleando recipientes de vidrio de mayor capacidad (1 L) y mediante aireación constante (flujo de aire estéril de 2 L min^{-1}) con una bomba de aire (Resun AC-2600, China). De esta forma, también fue posible asegurar una agitación completa del caldo de cultivo. La Figura 10 muestra cultivos por lote optimizados de la cepa MHP41.

Para el control de degradación de simazina, *Pseudomonas* sp. MHP41 se creció en placas de agar TSA suplementado con simazina (3,5 mM) y se incubó a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego de 5 ó 6 d se observó un halo de transparencia alrededor de la colonia, que indica degradación de simazina (Hernández *et al.*, 2008c, véase Fig. 6).

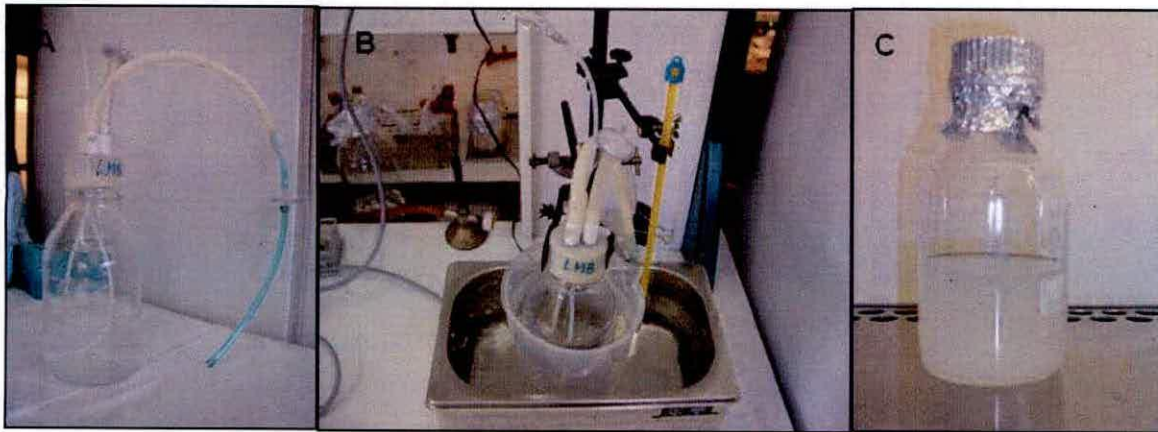


Figura 10. Cultivos optimizados de *Pseudomonas* sp. MHP41 mediante influjo continuo de aire estéril. A) Frasco MM-Sz inoculado con la cepa MHP41 y conexiones de entrada y salida de aire estéril. B) Incubación del cultivo por lote en baño de agua en un rango de temperatura de $28 - 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. C) Cultivo denso de la cepa MHP41 crecido ($3 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$) luego de 10 d de incubación.

4. Suelos agrícolas

En esta tesis se emplearon dos tipos de suelos agrícolas obtenidos desde el sector de Pochay, provincia de Quillota, Región de Valparaíso (Lat $32^{\circ} 52' \text{ S}$, long $71^{\circ} 11' \text{ O}$), que se ilustra en la Figura 11. La distribución político-administrativa de la Región de Valparaíso corresponde a 7 provincias, dentro de las cuales se encuentra la provincia de Quillota, la que a su vez se divide en 7 comunas, encontrándose entre éstas la comuna de

Pocochay. Basados en la clasificación de Luzio y Alcayaga (1992) se puede establecer que estos suelos corresponden a suelos aluviales del valle central (V a VII Región), que pertenecen al orden de los Alfisoles, Mollisoles y Entisoles. Las series de suelos presentes en el sector son San Isidro, Hijuelas, Ocoa, Las Chilcas, Pucalán, Tabolango, Catemu, Los Pidenes, Artificio, Chagres, Mantagua, Las Varillas, Lo Campo, Quillota y Calera (CIREN CORFO, 1993), (Fig. 12). De estas series la mayoría corresponde a suelos del orden de los Mollisoles, los cuales se destacan por ser suelos profundos, con un horizonte superficial negro, rico en materia orgánica, que se ha formado en condiciones de pradera o estepa, lo que permite que sean suelos muy fértiles. También están presentes los suelos Alfisoles, los cuales se caracterizan por tener un horizonte B que presenta un incremento de arcilla en relación al horizonte A. El tercer orden de suelo que es posible encontrar, tiene un horizonte B bien definido, pudiendo presentar un horizonte superficial con alto contenido de materia orgánica.

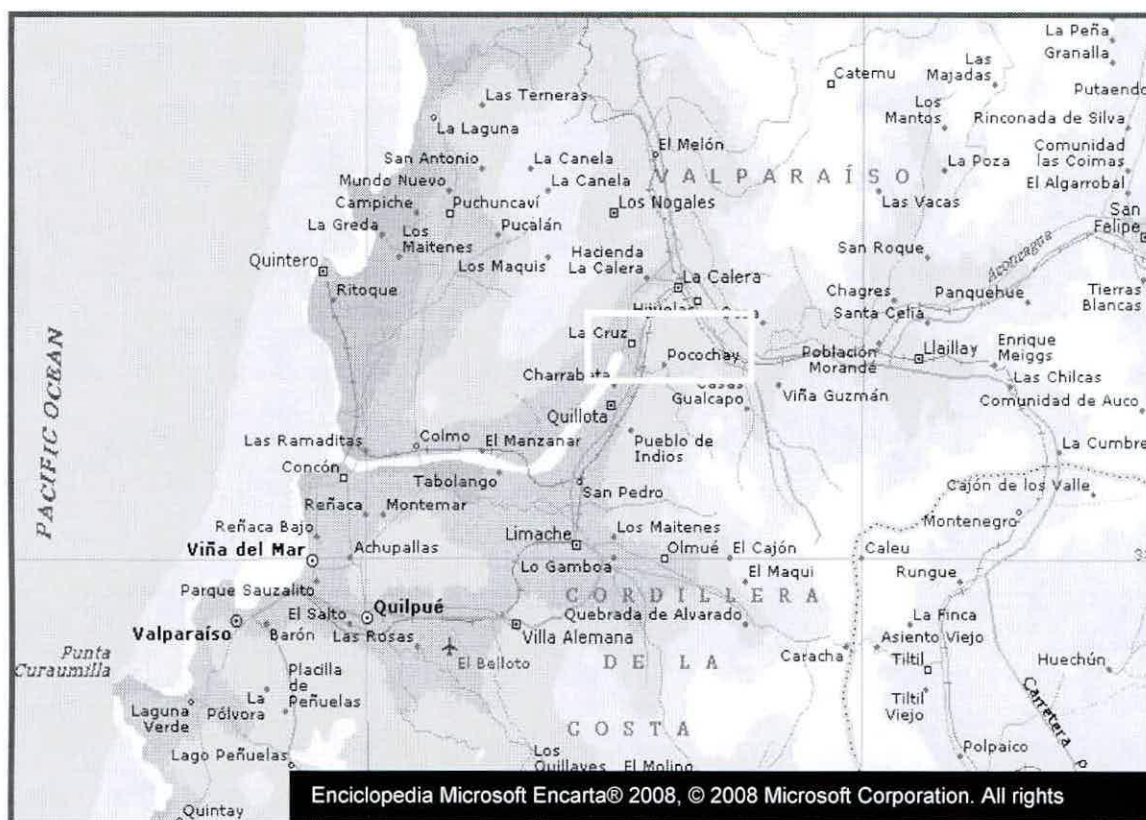


Figura 11. Localización de la comuna de Pocochay en la Región de Valparaíso. El recuadro amarillo indica el sector de muestreo de los suelos agrícolas de la Región de Valparaíso estudiados en esta tesis.

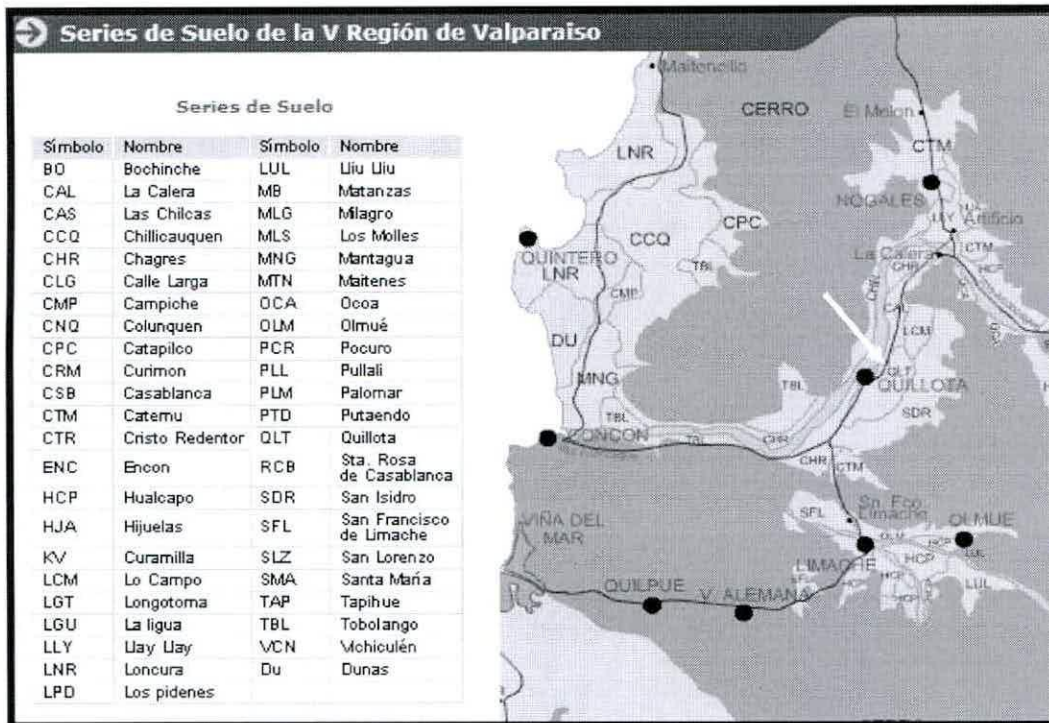


Figura 12. Serie de los suelos de la Región de Valparaíso. La flecha amarilla indica la serie de los suelos estudiados en esta tesis. (Fuente de información: Centro Tecnológico de Suelos y Cultivos (CTSyc) de la Universidad de Talca; <http://www.ctsyc.cl>)

El desarrollo económico de la zona está basado principalmente en la actividad silvo-agropecuaria debido a las buenas características climáticas y de suelos, de la cual el 30% se dedica a la agroindustria, especialmente a la horto-fruticultura, experimentando un gran auge la producción frutícola (ODEPA y CIREN 2004). La zona de extracción se caracteriza por una posición geográfica de pie de colina (*piedmont*), y una buena aptitud agrícola.

Los suelos estudiados provienen de predios con actividad agrícola y fueron denominados como A y B, respectivamente. El suelo tipo A, se recolectó desde un sector colindante a un cultivo de claveles. Este suelo no tiene historial de aplicación de simazina u otro herbicida del tipo s-triazinas. El suelo tipo B, se recolectó desde un cultivo agrícola de paltos que es tratado anualmente con simazina comercial ($3,5 \text{ kg ha}^{-1}$) desde hace más de 20 años para el control de malezas.

Los suelos empleados fueron obtenidos desde el estrato 0 – 20 cm de profundidad (suelo superficial), previa eliminación de hojas y plantas. Se procedió al tamizado con

Los suelos empleados fueron obtenidos desde el estrato 0 – 20 cm de profundidad (suelo superficial), previa eliminación de hojas y plantas. Se procedió al tamizado con mallas metálicas de 5 mm, 2,8 mm y 2 mm para lograr una textura homogénea y eliminar piedras y otros elementos no deseados del suelo (Fig. 13). Además se dejaron secar al aire libre (Santiago-Mora *et al.*, 2005), hasta alcanzar valores de humedad de entre un 15% y 20%. La humedad inicial en ambos tipos de suelo se determinó para ajustar la cantidad de suelo inicial, ajustando al rango óptimo con agua destilada estéril. Finalmente se conservaron a 4 °C, hasta la realización de los estudios.

La contaminación controlada de los suelos agrícolas se realizó con simazina comercial (Gesatop, 90% de simazina). En el suelo tipo A se emplearon dos dosis iniciales de simazina: 100 ppm y 10 ppm. Para el suelo tipo B se empleó la dosis 13 ppm. Los cálculos de concentración considerando las dosis aplicadas según prácticas agrícolas estándar de 3,5 kg ha⁻¹ (equivalente a 13 ppm o mg kg⁻¹). Para la contaminación de suelo tipo B irradiado, el Gesatop se esterilizó en autoclave y se adicionó al suelo (13 ppm) en solución con agua estéril bajo campana de flujo laminar.

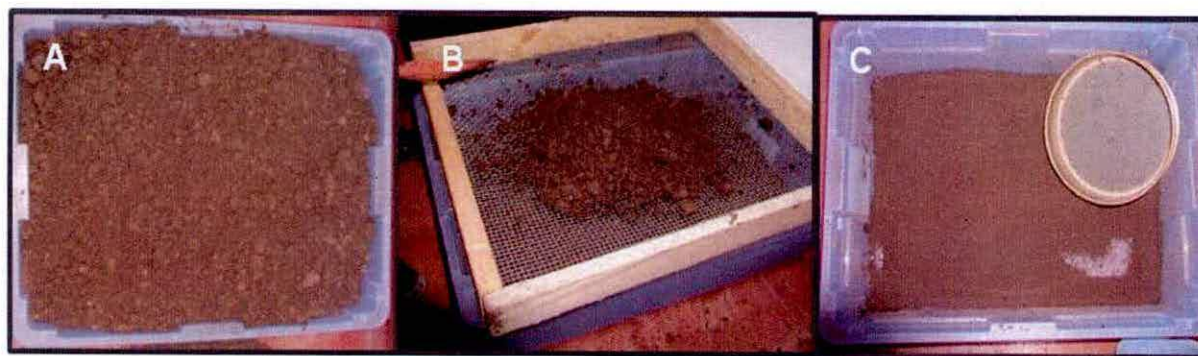


Figura 13. Proceso de tamizado de los suelos. A) Suelo recolectado sin restos vegetales ni piedras. A) Tamiz 5,8 mm. B) Tamiz 2,8 mm.

4.1. Caracterización del suelo

La determinación de las propiedades físico-químicas del suelo tipo A se realizó en el Laboratorio de Suelos y Análisis Foliar de la Facultad de Agronomía (PUCV) en Quillota. En el caso del suelo tipo B, los análisis fueron realizados por gentileza del Dr.

Quillota. En el caso del suelo tipo B, los análisis fueron realizados por gentileza del Dr. Edward Moore, en el Macaulay Land Use Research Institute, Aberdeen, Escocia. La metodología empleada fue descrita previamente por Nelson y Sommers (1996). El pH del suelo se determinó empleando una mezcla de suelo/agua desionizada en proporción 1:3 (p/v). El contenido de carbono orgánico se realizó mediante el método de oxidación de dicromato. En la sección de resultados (Tabla 13) se muestra la caracterización de los suelos A y B.

5. Estudios de adsorción de simazina en suelos

Durante el desarrollo de esta tesis se trabajó en conjunto con la Ing. Cecilia Flores de la UTFSM, para establecer y describir las interacciones entre el herbicida simazina y los suelos mediante isothermas de adsorción y entalpía de adsorción.

5.1. Isothermas de adsorción

Para determinar las isothermas de adsorción de simazina se realizaron experimentos de tipo batch según protocolos establecidos (Selim, 2003; Flores, 2007; Flores *et al.*, 2008). Se preparó soluciones de simazina en CaCl_2 0,005M con las siguientes concentraciones: 100, 30, 20, 10, 5 y 2 ppm. Las soluciones de simazina se pusieron en contacto con 20 g de suelo (peso en base seca) en una proporción de 4:1 en matraces de vidrio de 125 mL. Los matraces se mantuvieron a temperatura ambiente en agitación fuerte. Se dejó decantar y 600 μL de muestra se obtuvieron a las 1, 6, 12, 24 y 48 horas. La muestra se diluyó en metanol (1:1) y luego se centrifugó para eliminar restos de suelo. Las muestras fueron almacenadas a 4° C. La simazina remanente en solución fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), empleando una columna C18, método isocrático, temperatura ambiente, fase móvil: 67 % acetonitrilo, 32,5 % agua y 0,5 % ácido fosfórico. La cuantificación se realizó empleando una curva de calibración generada con un estándar de simazina.

Los métodos comúnmente empleados para análisis de isothermas de adsorción son el modelo lineal y el modelo de Freundlich. El modelo lineal relaciona la concentración de un compuesto en solución y la concentración en la superficie adsorbente, a través de un

coeficiente de distribución K_d expresado en $L\ kg^{-1}$. La metodología para obtener este coeficiente consiste en realizar una regresión lineal (R^2) de los datos de las isothermas donde K_d es la pendiente de la recta.

El modelo de Freundlich, en tanto, establece una relación no lineal entre la concentración del compuesto en solución y la concentración en la superficie adsorbente, también a través de un coeficiente denominado de Freundlich (K_f). Los parámetros del modelo de Freundlich se obtienen graficando los logaritmos de los valores de las isothermas, donde K_f es el intercepto de la recta que se genera y el valor n (índice de no linealidad) es la pendiente de la recta.

Las isothermas de adsorción se obtuvieron graficando para cada tiempo de muestreo la concentración de simazina adsorbida en suelo (S) ($mg\ kg^{-1}$) obtenidas por balance de masa simple (concentración en solución menos concentración inicial) versus la concentración de simazina en solución (C) ($mg\ L^{-1}$).

El coeficiente de distribución K_d se obtuvo de la linealización de las isothermas de adsorción:

$$K_d = S/C$$

El coeficiente de distribución K_f se calculó a través de la linealización de las isothermas según el modelo de Freundlich:

$$\log S = \log K_f + 1/n \log C$$

donde S y C son los parámetros ya descritos, y K_f y n son constantes.

El coeficiente de adsorción normalizado a contenido de materia orgánica K_{OC} se calculó respecto al porcentaje de materia orgánica de cada suelo.

$$K_{OC} = K_d \cdot \frac{100}{OC} \qquad OC = \frac{MO}{1,72}$$

donde OC es el porcentaje de carbono orgánico del suelo y MO el porcentaje de materia orgánica.

5.2. Entalpía de adsorción.

Por su parte, la entalpía de adsorción permite determinar si la adsorción del compuesto al suelo es de carácter físico o químico. Si los valores de entalpías están comprendidos entre 8 a 40 (kJ mol⁻¹) la adsorción es física y reversible.

Para determinar la entalpía de adsorción de simazina en suelo con y sin historial de aplicación de herbicidas se realizaron experiencias según el protocolo establecidos (Gupta, 2005; Gupta, 2006; Flores, 2006; Flores *et al.*, 2008). Se preparó soluciones de simazina en CaCl₂ 0,005M con las siguientes concentraciones: 20, 10 y 5 ppm. Las soluciones de simazina se pusieron en contacto con 10 g de suelo (peso seco) en una proporción de 4:1 en matraces de vidrio de 125 mL. En la primera etapa, los matraces se mantuvieron a 25 °C con agitación fuerte. La toma de muestra se realizó a las 6 horas de comenzada la experiencia. Se dejó decantar y 600 µL del sobrenadante se mezclaron con metanol (1:1). Luego se centrifugó para eliminar restos de suelo. Las muestras se almacenaron a 4 °C. Para la segunda etapa se preparó otro set de matraces. Las soluciones de suelo y simazina se mantuvieron a 35 °C con agitación fuerte. La toma de muestras también se realizó a las 6 horas, de la forma ya descrita. Las muestras se almacenaron a 4 °C. La simazina remanente en solución fue cuantificada en HPLC según el protocolo descrito previamente.

Para calcular la entalpía de adsorción se realizó el ajuste de los datos según el modelo de Langmuir:

$$\frac{1}{S} = \frac{1}{Q_0} + \frac{1}{bQ_0C}$$

donde S y C son los parámetros ya descritos, y Q₀ (mg kg⁻¹) y b (L mg⁻¹) son las constantes del modelo de Langmuir asociadas a la capacidad máxima de adsorción y a la energía de adsorción, respectivamente.

Una vez ajustado los datos, la entalpía de adsorción se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta H^\circ = R \cdot \left(\frac{T_2 T_1}{T_2 - T_1} \right) \cdot \ln \left(\frac{b_2}{b_1} \right)$$

donde T_2 y T_1 son las temperaturas empleadas en las experiencias, R es la constante universal de los gases ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) y b_1 y b_2 se obtienen del ajuste de Langmuir ya descrito.

6. Estudios de biorremediación de simazina a escala de microcosmos

La biorremediación de suelo agrícola tratado con simazina mediante la bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 se estudió, en una primera etapa, a escala de microcosmos.

6.1. Diseño experimental.

Cada microcosmos consistía de 150 g de suelo tamizado y tratado con simazina. La Figura 14 muestra el diseño experimental general del ensayo de bioaumentación a escala de microcosmos. Se consideraron tres variables principales para el diseño experimental: *i*) tipo de suelo, *ii*) dosis de tratamiento con simazina y *iii*) inoculación con la cepa MHP41. Otras variables estudiadas solo en suelos tipo B fueron: *iv*) perturbación de la microbiota nativa de suelos y *iv*) presencia de plantas.

El experimento se realizó considerando triplicados o duplicados de los microcosmos, los que a su vez fueron sacrificiales por tiempo de muestreo. La toma de muestras se realizó por triplicado cada 7 d durante 4 semanas.

Para el armado de los microcosmos se utilizó frascos de vidrio de 500 mL, con una base de 7 cm de diámetro. Los microcosmos se mantuvieron a temperatura ambiente en los meses de marzo a mayo, período en el que se registró una temperatura media de 22 °C (Laboratorio de Evaluación Solar, 2007, Universidad Técnica Federico Santa María). En el caso de los microcosmos con suelos irradiados, la manipulación de los mismos fue siempre en condiciones de esterilidad.

El primero de los experimentos de microcosmos contempló el empleo de suelo tipo A (sin historial de aplicación de simazina). La Tabla 7 resume los diferentes tratamientos en experimentos de microcosmos con suelo tipo A. El experimento se realizó por triplicado.

El segundo experimento a escala de microcosmos contempló la utilización de suelo tipo B (con historial de aplicación de simazina). En esta etapa, se analizó la degradación de simazina en estos suelos considerando como variables de estudio la inoculación con la cepa MHP41 (Tabla 7). En una etapa posterior, se estudió el efecto de perturbación microbiana de los suelos (irradiación gamma) con el objeto de disminuir la carga microbiana nativa de los mismos y la presencia de plantas (Tabla 8). Para el set de microcosmos con plantas se implementó un sistema de fotoperiodo (11 horas de luz y 13 horas de oscuridad). Debido a la magnitud de este segundo ensayo de bioaumentación (suelos tipo B), el experimento se realizó por duplicado.

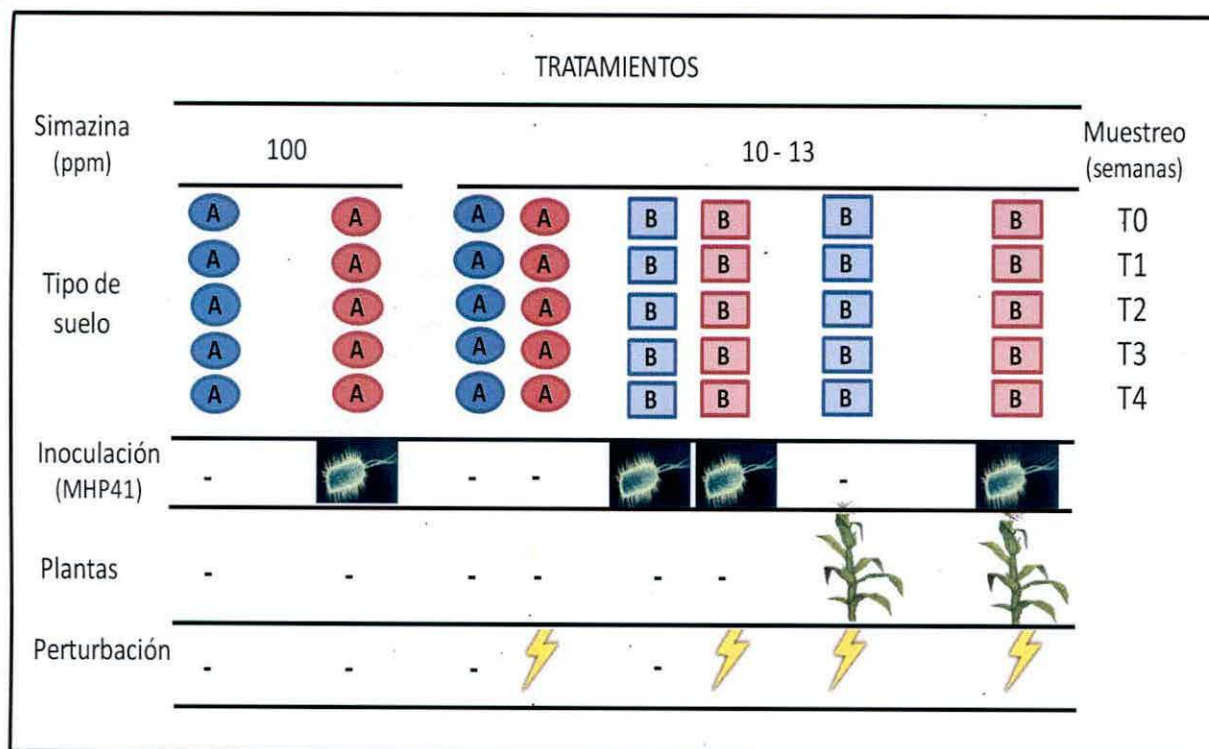


Figura 14. Diseño experimental en estudios de bioaumentación de simazina por *Pseudomonas* sp. MHP41 a escala de microcosmos.

Tabla 7. Tratamiento experimental de suelo agrícola tipo A sin historial de aplicación de simazina.

NOMENCLATURA	TRATAMIENTO	
	Simazina (ppm)	<i>Pseudomonas</i> sp. MHP41
I	100	-
II		+
III	13	-
IV		+

6.2. Perturbación de la microbiota nativa del suelo

El proceso de irradiación de los suelos con historial de aplicación de herbicidas se realizó en la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN), Santiago. Se aplicaron tres dosis de 25 kGy de rayos gamma (Fig. 15). Este método se seleccionó debido a la menor alteración que provoca sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo versus otras alternativas, como lo es el tratamiento de esterilización por autoclave.



Figura 15. Tratamiento con radiación gamma de suelos tipo B. A) Etiqueta de identificación de CCHEN. B) Microcosmos con suelos perturbados no inoculados (tratamiento IX). C) Microcosmos con suelos perturbados no inoculados con plantas (tratamiento X).

Tabla 8. Tratamientos experimentales de suelo agrícola tipo B con historial de aplicación.

NOMENCLATURA	TRATAMIENTO			
	Simazina (ppm)	<i>Pseudomonas</i> sp. MHP41	Perturbación	Plantas
V	13	-	-	-
VI		+	-	-
VII		-	+	-
VIII		+	+	-
IX		-	+	+
X		-	-	+

6.3. Empleo de plantas en microcosmos

Para los microcosmos con plantas, se emplearon semillas de maíz Morgan M10/M10 IMI. Este maíz no tiene modificación genética (Fig. 16). Las semillas fueron esterilizadas para evitar la proliferación de hongos, según el siguiente protocolo: inmersión en etanol por 30 s, lavado con agua estéril (2 veces), inmersión en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por 15 a 20 min y lavado con agua estéril durante 4 minutos (2 veces). Las semillas se hicieron germinar en placas de Petri estériles, sobre un papel de filtro embebido en agua estéril, en presencia de luz y a temperatura ambiente. Las plántulas crecidas al cado de 10 d fueron plantadas en los microcosmos, en condiciones de esterilidad.

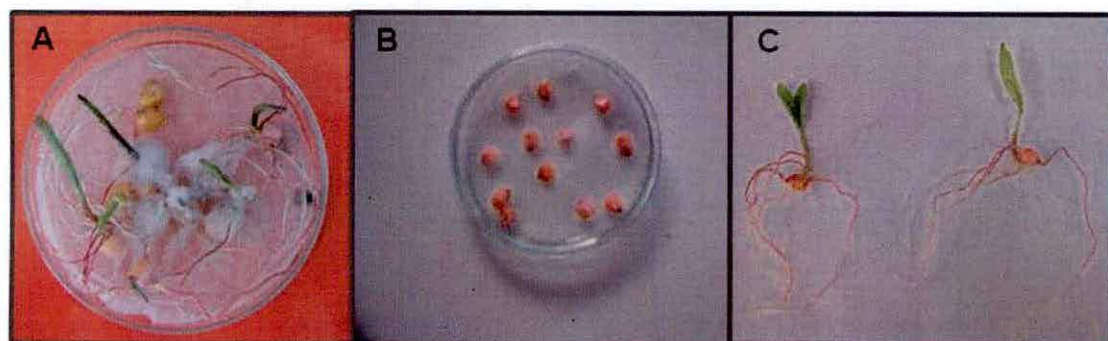


Figura 16. Germinación de semillas de maíz empleadas en los microcosmos con plantas. A) Semillas sin esterilización. **B)** Germinación de semillas de maíz esterilizadas e incubadas a temperatura ambiente con agua estéril (0 d). **C)** Plántulas de maíz estériles germinadas (10 d).

6.4. Bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41

Pseudomonas sp. MHP41 se inoculó a los microcosmos, inmovilizada en cápsulas de alginato de sodio en una concentración final de 10^8 UFC g^{-1} de suelo seco y una frecuencia de inoculación de entre tres y cuatro días (Newcombe *et al.*, 1999). En el caso de los experimentos de microcosmos, el inóculo fue incorporado con una espátula y fue cuidadosa y uniformemente distribuido a fin de asegurar la homogeneidad del sistema y la reproducibilidad de los resultados. Para los experimentos de campo, la inoculación se realizó en el estrato superior del suelo (0-5 cm) y fue mezclado con espátula para homogeneizar. En ambos casos, la inoculación se realizó repetidas veces (cada 3 o 4 d)

Para la inmovilización de las células de MHP41, un cultivo en fase de crecimiento exponencial ($turbidez_{600\text{ nm}} \sim 0,8$) se centrifugó y las células se lavaron 2 veces con NaCl 0,85%. El pellet bacteriano se resuspendió en una solución estéril de alginato de sodio 1% p/v. A continuación la suspensión células/alginato se liberó gota a gota con una solución levemente agitada de cloruro de calcio ($9,3\text{ g L}^{-1}$). Las cápsulas así formadas de 2 a 3 mm de diámetro se dejaron reposar a 4 °C. Para los tratamientos no inoculados, se adicionó cápsulas de alginato estériles, es decir, sin células de *Pseudomonas* sp. MHP41.

La conservación de las cápsulas se realizó en MM 0,5x sin fuente de nitrógeno a 4 °C. De esta manera, la cepa se preservó un máximo de 4 d antes de ser inoculada al suelo.

La viabilidad de *Pseudomonas* sp. MHP41 inmovilizada se realizó mediante recuento de UFC mL^{-1} en placas con TSA suplementadas con simazina. Una metodología similar fue descrita por Vancov *et al.*, (2005).

6.5. Toma de muestras y análisis realizados

Se detallan a continuación los análisis realizados en cada tiempo de muestreo.

1) Control de humedad:

La determinación de humedad se realizó a partir de 1 g de muestra en balanza analítica con detector de de humedad por desecación por infrarrojo (Balanza Sartorius). Todos los resultados se expresan por gramo de suelo seco.

2) Recuento de heterótrofos cultivables:

En matraces Erlenmeyer a 10 g de suelo se adicionó 90 mL de solución NaCl 0,85% y se agitó (300 rpm) durante 2 horas. Las muestras se dejaron decantar por 2 horas a 4°C. La determinación de los microorganismos heterótrofos cultivables se realizó mediante recuento de UFC g⁻¹ en placas con medio TSA. Tres diluciones seriadas (100 µL de muestra en 900 µL de NaCl 0,85% p/v) y consecutivas se plaquearon en triplicado. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 o 72 h. Finalmente se seleccionó aquellas placas que contenían entre 30 y 300 UFC por placa. El resultado se expresó como UFC g⁻¹ de suelo seco.

3) Determinación de actividad catabólica de simazina mediante número más probable (NMP):

Para la determinación de la actividad catabólica de degradadores de simazina (ACDS) se empleó la técnica de número más probable (NMP) y detección con sal de trifenil tetrazolio (TTZ), (Dinamarca *et al.*, 2007). En tubos de ensayo con 1 g de suelo se agregó 9 mL de solución medio mínimo que contenía simazina 0,5 mM y se llevó a agitación por 2 horas. Se dejó decantar por 2 horas a 4°C. En tubos Eppendorf se realizaron diluciones seriadas (100 µL de muestra en 900 µL de solución medio mínimo-simazina 0,5 mM). Se tomó una alícuota de cada dilución y se llevó a microplaca por triplicado (metodología de número más probable, NMP). Las microplacas se incubaron a 28°C por 4 d. Se adicionó TTZ-metanol (concentración final 0,1%), y se incubó hasta la aparición de coloración rosada, indicador de que el TTZ fue reducido por la cadena de transportadores de electrones de las bacterias presentes. Se determinó el NMP g⁻¹ de suelo seco a través del programa MPN Calculador (Dinamarca *et al.*, 2007). Los resultados se expresaron como células de microorganismos con actividad degradadora de simazina (células g⁻¹ de suelo seco).

4) Determinación de concentración de simazina en suelo

En tubos Falcon se pesó 10 g de suelo y se agregó 20 mL de una solución metanol (80% v/v), pH=2. Se llevaron a agitación por 2 horas y luego se dejó decantar a 4°C. Se determinó la concentración de simazina en el sobrenadante por HPLC. Para esto se utilizó una columna C-18 (Supelco), sistema isocrático, temperatura ambiente y flujo de 0,5

mL/min. La fase móvil contiene 67 % acetonitrilo, 32,5 % agua y 0,5 % ácido fosfórico (Flores *et al.*, 2008a).

7. Estudios de biorremediación de simazina a escala de campo

La biorremediación de simazina en suelo con la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 se estudió, además, a escala de campo. En este caso, se consideró para el diseño experimental la variable inoculación con la cepa MHP41 inmovilizada en matriz de alginato. Dada la magnitud del experimento, el mismo se realizó en duplicado.

Se seleccionó el suelo agrícola tipo A (sin historial de aplicación de simazina). La contaminación controlada del suelo agrícola se realizó con simazina comercial (Gesatop, 90% de simazina). En este estudio el suelo se trató con altas dosis de simazina (100 ppm). Se determinó la humedad como se describió previamente. Para cada tiempo de muestreo la humedad se ajustó al rango óptimo (15% a 20%) con agua de regadío.

7.1. Diseño experimental

El diseño experimental a campo se realizó considerando tres áreas de estudio (3 m x 1 m x 20 cm), cada una bien delimitada e identificadas como S1, S2 y S3, respectivamente (Fig. 17). Dos de ellas (S1 y S2) estaban separadas por una distancia de 2 m una de otra y fueron contaminadas con simazina comercial. La tercera (S3) se ubicó a 8 m de distancia de S1 y S2 y no se contaminó con simazina. S1 se inoculó con la cepa MHP41 inmovilizada cada 7 días, mientras que el área S2 se adicionó cápsulas estériles con la misma frecuencia. S3 se consideró como área control no inoculado. La temperatura y la humedad se monitorearon cada 3 o 4 d.

Desde cada zona experimental se recolectó 3 muestras al azar (30 g). Las mismas se mezclaron y homogeneizaron para las determinaciones analíticas y microbiológicas descritas anteriormente (sección 6.5). La toma de muestras se realizó por triplicado cada

7.2. Bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41

Pseudomonas sp. MHP41 se inoculó en la zona A1, inmobilizada en cápsulas de alginato de sodio en una concentración final de 10^8 - 10^9 UFC g^{-1} de suelo seco y una frecuencia de inoculación de entre 3 ó 4 d. Para los tratamientos no inoculados (S2), la inoculación se realizó con cápsulas de alginato estériles, sin células de *Pseudomonas* sp. MHP41.

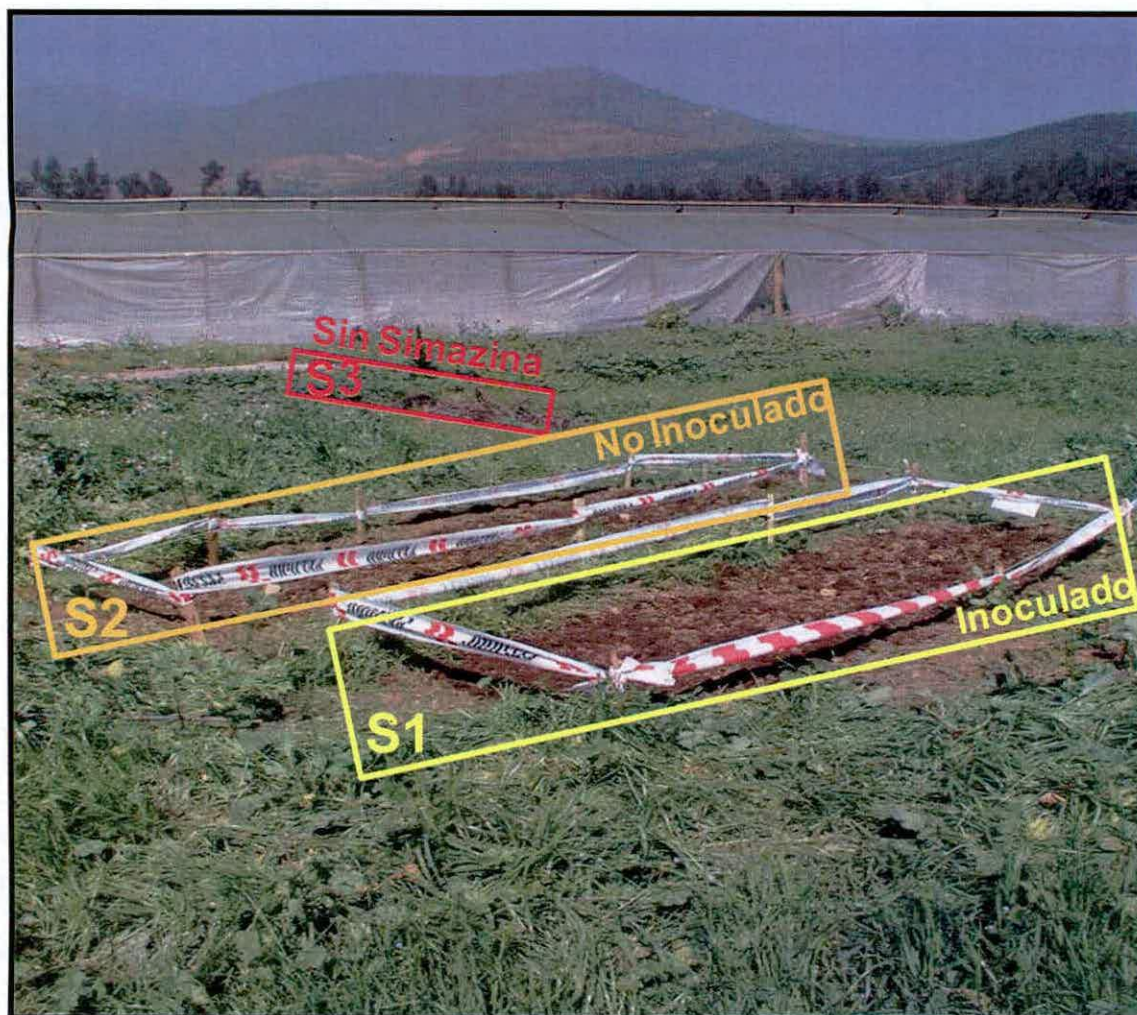


Figura 17. Sitios en estudios de bioaumentación de simazina por *Pseudomonas* sp. MHP41 a escala campo.

8. Métodos de biología molecular

8.1. Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico desde cepas puras se realizó mediante el siguiente protocolo. Se tomó una alícuota de 500 μl de un cultivo en fase de crecimiento exponencial y se calentó a 95 °C durante 10-15 min. Luego la suspensión se colocó en hielo por 2 min y se centrifugó (10.000 g, 5 min). El pellet se resuspendió en 100 μl de agua calidad biología molecular.

8.2. Extracción de DNA comunitario desde suelo agrícola

La extracción de DNA comunitario desde muestras de suelo se realizó mediante dos estrategias que se explican a continuación.

Para la construcción de genotecas, el DNA se extrajo desde muestras de suelo provenientes directamente del campo (por triplicado) y mediante el método modificado descrito por Nogales *et al.*, (1999) como se detalla a continuación. 1 g de muestra fue embebida en nitrógeno líquido y disgregada con un mortero de cerámica. Las muestras pulverizadas fueron resuspendidas en 2,4 mL de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM EDTA, pH 8.0; 100 mM de buffer fosfato de sodio, pH 8.0) que contiene 10 mg mL⁻¹ proteinasa K y 300 mg mL⁻¹ lisozima. La suspensión se incubó a 37 °C por 30 min a 150 rpm. Posteriormente, se adicionó 600 μl de SDS 10% (incubar a 37 °C por 30 min a 150 rpm) y 600 μl de una solución que contiene 10% CTAB (bromuro de hexadecilmethylamonio) y 0,7 M NaCl (incubar a 65 °C por 15 min). Luego las muestras fueron expuestas a 3 ciclos consecutivos de shock térmico (inmersión en nitrógeno líquido y calentamiento a 65 °C por 10 min). La suspensión se centrifugó a 4 °C (6.000 rpm, 10 min). El sobrenadante, conteniendo el DNA comunitario se colectó en tubos eppendorf y el pellet se sometió a otro ciclo de extracción como se describió anteriormente. El sobrenadante de ambas extracciones se trató con un volumen de

fenol:chloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) y se mezcló bien. Este paso se repitió 3 veces o hasta obtener la clarificación total de la muestra. El DNA en la fase acuosa se precipitó (0,1 volumen de acetato de sodio 3M, pH 4,8 y 0,7 volúmenes de isopropanol) y se incubó toda la noche a -20 °C. Luego se centrifugó (10.000 g, 30 min), se lavó dos veces en etanol 70% v/v, se secó al temperatura ambiente y se resuspendió en agua milli-Q (Millipore) estéril. Finalmente, el DNA se sometió a un nuevo ciclo de extracción y purificación con el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) según protocolo del fabricante. Con este protocolo se obtuvo concentraciones de DNA de suelo de aproximadamente 70 a 90 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ y se guardó a -20 °C hasta su empleo.

Para experimentos de T-RFLP, el DNA se extrajo desde 1 g de muestras de suelos provenientes de ensayos de bioaumentación (por triplicado) y mediante el empleo de un kit comercial "Ultra Clean Soil DNA Kit" (MoBio Laboratories, Inc. Solana Beach, GA)

8.3. Visualización y cuantificación de DNA

El DNA extraído se cuantificó por espectrofotometría o en gel de agarosa. En el primer caso, se midió la absorbancia mediante el fluorómetro Qubit (Invitrogen, CA) según las especificaciones del fabricante. El DNA extraído y purificado se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8% p/v) y tinción con bromuro de etidio

Para cuantificar el DNA en gel de agarosa, se comparó visualmente la intensidad de la banda de DNA, luego de teñirlo en una solución bromuro de etidio, respecto a las distintas bandas del estándar molecular Lambda digerido con la enzima de restricción *Pst*I.

8.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Mastercycler Personal Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) con el siguiente programa: desnaturalización a 94 °C durante 3 min, seguida de 30 ciclos consistentes en 30 s a 94

°C; 44 °C por 1 min, 72 °C por 2 min y finalmente un paso de elongación durante 10 min a 72 °C. La mezcla de reacción consistió en: 2,5 µl de buffer *Taq* polimerasa 10X (Invitrogen, CA.); 2,5 µl de dNTP's 1 mM (Invitrogen); 1,0 µl de MgCl₂ 50 mM; 2,5 µl de cada cebador 10 mM (Invitrogen); 0,7 U *Taq* polimerasa (Invitrogen) y 1 a 2 µl de DNA templado, en un volumen final de 25 ó 50 µl.

Para la amplificación del gen 16S rRNA se empleó cebadores habituales para el dominio *Bacteria*: GM3 (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3') y GM4 (5'-TACCTTGTTACGACTT-3'), que permiten amplificar fragmentos de DNA de unas 1500 pb que, prácticamente, incluyen el gen completo (Bruce *et al.*, 1992).

Posterior a la reacción de PCR del DNA comunitario de muestras de suelos, se realizó un paso de reacondicionamiento de los productos de PCR, según metodología previamente descrita (Thompson *et al.*, 2002).

Las mezclas de reacción (25 ó 50 µl) se cargaron en un gel de agarosa al 0,8% y se separaron durante 40 min a 100 V. A continuación se tiñó con bromuro de etidio y se visualizaron las bandas con luz ultravioleta y se confirmó el tamaño adecuado (1400-1500 pb).

8.5. Purificación de DNA

Se utilizó el kit comercial Qiaquick PCR purification (Qiagen, Germany) siguiendo el protocolo del fabricante y eluyendo el DNA en 30-60 µl de agua milli-Q (Millipore) estéril.

8.6. Digestión de DNA con endonucleasas de restricción y análisis de polimorfismo mediante ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restiction Analysis).

Para comparar los perfiles de restricción de las cepas *Pseudomonas* sp. MHP41 y *Pseudomonas* sp. ADP. El gen 16S rRNA amplificado se digirió con las endonucleasas de

restricción *MspI* y *HhaI*, siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Fermentas, Ontario). Para detectar diferencias entre las bacterias, se analizaron los patrones de restricción del gen 16S rRNA mediante electroforesis (MiniProtean, Biorad) en gel de acrilamida (8%; buffer Tris-borato EDTA), a 130 V durante 60 min, y tinción con bromuro de etidio (Hernández *et al.*, 2008c).

9. Librerías génicas de suelos agrícolas

Los productos de PCR obtenidos (ver sección 6.2.) se clonaron en el vector plasmídico pGEM-T Easy, empelando el kit comercial pGEM-T Easy (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante.

9.1. Selección de clones

El vector pGEM-T Easy posee una región que codifica para la β -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina (Amp^r). Las bacterias sensibles a ampicilina se vuelven resistentes al ser transformadas con el vector pGEM-T Easy. Cuando se liga un inserto (DNAr 16S) al vector se produce una disrupción en el marco de lectura de la región que codifica para la β -galactosidasa, lo que impide la expresión de esta enzima. Dado que la acción de la β -galactosidasa sobre el X-Gal (sustrato) hace que se libere un compuesto de color azul, la inserción de un fragmento de DNA en el vector se evidencia por la ausencia de color azul.

La selección de los clones se basa en las observaciones que se describen a continuación: *i*)- células sin vector, no crecen *ii*)- células con vector sin inserto, crecen colonias azules, *iii*)- células con vector con inserto, crecen colonias blancas

Las colonias blancas fueron seleccionadas para verificar por PCR que contuvieran el inserto buscado. Cada una de ellas fue aislada con un palillo de madera estéril y colocada en un tubo Eppendorf para realizar la reacción de PCR utilizando cebadores

específicos del vector (pUC/M13f y pUC/M13r). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,2%.

Por otra parte, se prepararon inóculos con el fin de obtener cultivos que permitan inmortalizar los clones. A tal efecto cada uno de los palillos utilizados anteriormente, conteniendo remanentes de la colonia aislada, fue introducido en un tubo conteniendo 3 mL de medio de cultivo LB (Luria-Bertani) con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina. Los inóculos de cada uno de los clones fueron incubados a 37 °C con agitación (200 rpm) durante toda la noche.

Por último, se tomó una alícuota de 800 μl de cada cultivo crecido hasta fase exponencial a la que se le añadió 200 μl de glicerol 100% (v/v) estéril; cada suspensión fue rápidamente homogeneizada y congelada a -80 °C. Los clones así tratados pueden ser conservados por largos períodos.

9.2. Secuenciación del fragmento del gen 16S rRNA clonado

La reacción de secuenciación se realizó en un volumen final de 10 μl , empleando los primers GM3, 518F (5'-CCA GCAGCC GCG GTA AT-3') y GM4. Se determinó la secuencia de nucleótidos utilizando como molde 5 μl de DNA plasmidial purificado que contenía el inserto (sección 9.1). Se empleó el kit comercial Dye Terminators premix (Applied Biosystems) según especificaciones del fabricante. La secuenciación se realizó en un secuenciador automático Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Servicios Científicos Técnicos, Universidad de las Islas Baleares, Palma de Mallorca). Los cromatogramas fueron analizados con el programa Chromas v1.45 (Griffith University, Queensland, Australia).

9.3. Análisis de las secuencias

Se obtuvo un total de 104 secuencias parciales y 21 secuencias completas del gen 16S rRNA de las muestras de suelos agrícolas. Las secuencias parciales (~500 a 800 pb)

se emplearon para la creación de un árbol filogenético. Los alineamientos se realizaron con el programa bioinformático ARB (www.arb-home.de; Ludwig *et al.*, 2004) que facilita el alineamiento y comparación de las secuencias obtenidas contra más de 200.000 secuencias simples del gen 16S rRNA disponibles en su base de datos (www.arb-silva.de; Pruesse *et al.*, 2007). Se realizó un análisis de máxima parsimonia empleando el filtro SSURef91. Las secuencias parciales obtenidas fueron depositadas en la base de datos Genbank con los siguientes números de acceso: FJ561497 a FJ561595. Las secuencias completas fueron revisadas y editadas mediante el programa bioinformático Sequencer v4.7 (Gene Codes Corp) y depositadas en la base de datos Genbank con los siguientes números de acceso: FJ468375 a FJ468395. Las secuencias completas fueron comparadas con secuencias del gen 16S rRNA disponibles en la base de dato EMBL Nucleotide Sequence Database (Baker *et al.*, 2000) empleando el programa FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/nucleotide.html>) con el objetivo de determinar relaciones filogenéticas.

9.4. Análisis de rarefacción y cálculo de índices de diversidad

Para realizar los análisis de rarefacción se empleó el programa Analytic Rarefaction v1.2 disponible en la web (www.uga.edu/~strata/Software.html). Para ello, las secuencias parciales fueron agrupadas a un nivel de similitud del 90, 97 y 99% mediante el programa Sequencher 4.7. Se calcularon los siguientes índices de diversidad: Shannon (H), Equitatividad (E), Dominance (D) y Margalef según previa descripción (Zaballos *et al.*, 2006). Para ello, se empleó el software PAST (Paleontological Statistics, versión 1.15, <http://folk.uio.no/ohammer/past>) para obtener los índices desde la totalidad de las secuencias obtenidas y analizadas en esta tesis.

10. Análisis de la dinámica de la comunidad microbiana de suelos agrícolas

Las variaciones en las comunidades microbianas de suelos agrícolas se estudiaron durante los experimentos de bioaumentación con la cepa *Pseudomonas* sp.

MHP41 a escala de microcosmos. Para tal fin, las estrategias moleculares empleadas fueron:

- Técnicas relacionadas con la expresión de genes rARN, mediante la hibridación in situ o Fluorescence In Situ Hybridization (FISH).
- Técnicas basadas en ácidos nucleicos, mediante el análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción terminales o Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms (T-RFLP).

Las muestras de suelo fueron recolectas y procesadas según los requerimientos de cada una de las metodologías empleadas y como se describe a continuación.

10.1. Hibridación *In Situ* (FISH)

Esta técnica se realizó a partir de muestras de suelos agrícolas de prevenientes de ensayos de bioaumentación en microcosmos previamente descritos i) suelo tipo A, contaminados con 100 ppm de simazina comercial y ii) suelo tipo B, contaminados con 13 ppm de simazina comercial (Fig. 14). Todas las muestras fueron analizadas por triplicados.

La metodología se realizó según protocolos establecidos (Zarda *et al.*, 1997; Musat *et al.*, 2006) con algunas modificaciones, según se detalla a continuación. La Figura 18 muestra el protocolo general de FISH.

Las sondas de oligonucleótidos típicamente consisten de 18 a 30 nucleótidos marcados en el extremo 5' con fluorocromos. Las sondas aptas para su utilización en protocolos de FISH han sido descritas en una amplia variedad de niveles taxonómicos así como los de protocolos adecuados para su diseño y evaluación (Hugenholtz *et al.*, 2001). En algunos casos, es necesario el uso de oligonucleótidos competidores (sondas no marcadas con fluorocromos) para evitar reacciones de hibridación cruzadas. El competidor en general difiere de la sonda en una base. La Tabla 9 muestra las sondas seleccionadas para la identificación de grupos filogenéticos específicos en los suelos estudiados.

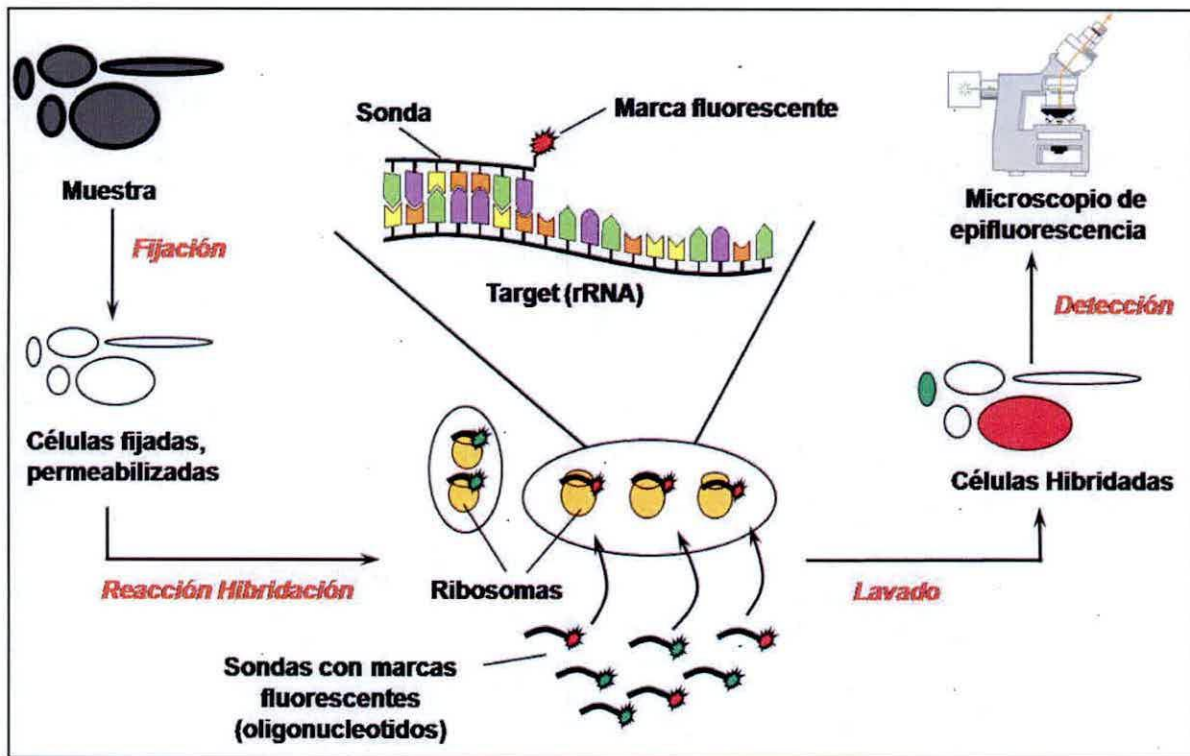


Figura 18. Esquema del protocolo general empleado para la técnica de Hibridación *In Situ* (FISH).

El criterio de selección se fundamentó en el uso de bases de datos de acceso público, útiles para la elección de sondas que fueron previamente publicadas y evaluadas experimentalmente en muestras ambientales, como por ejemplo ProbeBase (<http://www.microbial-ecology.net/probebase/>). La especificidad de las secuencias seleccionadas se analizó mediante la base de datos: Ribosomal Data Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>). La Tabla 10 muestra porcentaje de secuencias dentro de nivel taxonómico que muestran.

Tabla 9. Sondas empleadas para FISH y sus respectivas condiciones de hibridación.

Sonda ^a	Secuencia (5' - 3')	RNA blanco ^b	Especificidad / Filiación Taxonómica ^c	Competidor	Formamida (% v/v)	Referencia	Número Acceso
EUB (I)	GCTGCCTCCCGTAGGAGT		Mayoría de las bacteria				pB-00159
EUB (II)	GCAGCCACCCGTAGGTGT	16S	Suplemento de EUB 338: <i>Planctomycetales</i>	no	35	Daims <i>et al.</i> 1999	pB-00160
EUB (III)	GCTGCCACCCGTAGGTGT		Suplemento de EUB 338: <i>Verrucomicrobiales</i>				pB-00161
ALF1B	CGTTCGYTCTGAGCCAG	16S	<i>Alphaproteobacteria</i>	no	10	Manz <i>et al.</i> 1992	pB-00017
BET42a	GCCTTCCCCTTCGTTT	23S	<i>Betaproteobacteria</i>	GAM42a	35	Manz <i>et al.</i> 1992	pB-00034
GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	23S	<i>Gammaproteobacteria</i>	BET42a	35	Manz <i>et al.</i> 1992	pB-00174
PLA886	GCCTTGCGACCATCTCCC	16S	<i>Planctomycetales</i> , mayoría Eukarya	cPLA886	35	Neef <i>et al.</i> 1998	pB-00284
HoAc1402	CTTTCGTGATGTGACGGG	16S	<i>Acidobacteria</i>	cHoAc1402	0-5	Juretschko <i>et al.</i> 2002	pB-00183
PS56a	GCTGGCCTAGCCTTC	23S	<i>Pseudomonadales</i>	no	0-5	Schönduve <i>et al.</i> 1996	pB-00289
ARCH915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	16S	Archaea	no	10	Stahl and Amann, 1991	pB-00027

^a Sondas marcadas con fluorocromo Cy3.

^b Subunidad ribosomal 16S o 23S de *E.coli*.

^c Base de Datos: Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Tabla 10. Porcentaje de especificidad de grupo de las sondas de oligonucleótidos de FISH seleccionadas para el análisis de las comunidades microbianas de suelos agrícolas.

Sonda ^a	Especificidad ^b	Filiación
EUB (I)	97% Bacteria	Dominio Bacteria
EUB (II)	1% Bacteria (Planctomycetes 92%)	
EUB (III)	1% Bacteria (Verrucomicrobia 71%)	
ALF1B	95% Alphaproteobacteria	Filum Proteobacteria
	5% otras (Verrucomicrobia; Acidobacteria; Proeobacteria; Nitrospirae etc.)	
	BET42a ND Betaproteobacteria	
GAM42a	ND Gammaproteobacteria	
PLA886	95% Planctomycetes	Filum Planctomycetes
	5% otras (Acidobacteria; Proeobacteria; Verrucomicrobia; etc.)	
HoAc1402	75% Acidobacterias	Filum Acidobacteria
	25% otras (Actinobacteria; Proteobacteria; Firmicutes; Verrucomicrobia; etc.)	
PS56a	ND Pseudomonas	Género Pseudomonas
ARCH915	82% Achaea	Dominio Achaea
	17% Achaea no clasificadas	
	< 1% Bacteria	

^a Selección de sondas desde la base de datos ProbeBase (<http://www.microbial-ecology.net/probebase/>).

^b Análisis de especificidad de la sonda mediante Ribosomal Data Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>).ND: No determinado

10.1.1. Fijación de las muestras de suelos

La Figura 19 esquematiza los procesos de fijación empleados en las muestras de suelo. Inmediatamente después de la toma de muestra, 10 g de suelo se mezcló con 20 mL de solución de PBS con formol al 4% v/v (filtrar). Las muestras se agitaron (sin vortex) durante 6 h a 4 °C. Posteriormente, 2 mL se centrifugaron (13.000 rpm durante 3 min) y el sedimento se lavó dos veces con PBS estéril para eliminar restos de formol. Finalmente

las muestras se resuspendieron en 2 mL de una solución de PBS:Etanol (1:1) y se almacenaron a -20 °C (Zarda *et al.*, 1997)

Como protocolo alternativo de fijación, 10 g de suelo se mezclaron con 20 mL de solución de PBS:Etanol (1:1). Posteriormente, las muestras se agitaron (sin vortex) durante 6 h a 4 °C. Finalmente, alícuotas de 2 mL de las muestras así fijadas se almacenaron a -20 °C.

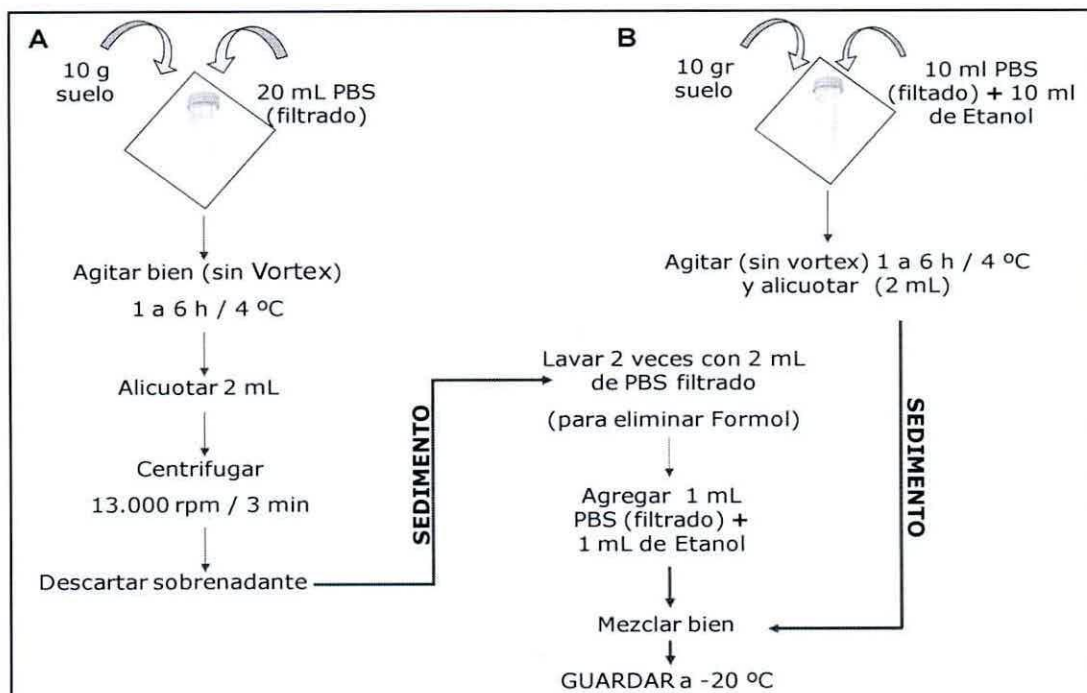


Figura 19. Esquema del protocolo de fijación de las muestras de suelo para FISH.

10.1.2. Preparación de la muestra en filtros

Se empleó el siguiente protocolo:

- a) Hacer diluciones (1/10) de las muestras fijadas en PBS en un volumen final de 10-15 mL. Colocar en baño de ultrasonido por 15 a 30 min (o sonicar con 2 pulsos de 1 min,

cada 5 min) para favorecer el desprendimiento de células bacterianas que permanecen retenidas a las partículas de suelo.

- b) Filtrar la muestra en filtros GTTP (0,22 μm , Millipore).
- c) Fraccionar los filtros en partes iguales y almacenar secos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- d) Una porción del filtro se tiñe con DAPI (dicloruro de 4,6-diamidino-2-fenilindol) para determinación de abundancia microorganismos (ver sección siguiente)
- e) Las porciones restantes del filtro se ocupan para la reacción de hibridación con las diferentes sondas marcadas.

10.1.3. Determinación de abundancia de microorganismos mediante tinción con DAPI

A una porción del filtro se agregó 15 a 20 μl de solución de DAPI ($1\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$) y se incubó 1-2 min a temperaturas inferiores a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (se recomienda trabajar sobre hielo). Luego se lavó con agua destilada, se pasó por etanol absoluto por 2-3 s y se secó a temperatura ambiente. Los filtros teñidos se guardaron protegidos de la luz a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

10.1.4. Reacción de Hibridación

Para la reacción de hibridación, una porción de filtro se colocó sobre un portaobjeto. La descripción de sondas empleadas, sus respectivas propiedades y el requerimiento de competidores se detallan en la Tabla 9. Simultáneamente se preparó 2 mL de la mezcla de hibridación como se describe en la Tabla 11. La mezcla consistió en Tris (pH 8), SDS, NaCl (5 M) y formamida. El volumen adicionado de formamida depende de los requerimientos de cada sonda (Tabla 9). A cada filtro se agregó 16 μl de mix y 2 μl de sonda ($50\text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) y su respectivo competidor en casos de requerirlo. Los filtros se incubaron a $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h en una cámara de hibridación que consistió en un tubo Falcon de 50 mL con un papel tissue embebido en el volumen sobrante del mix de hibridación (sin sonda).

10.1.5. Etapa de lavado

Se preparó 50 mL de buffer de lavado, adicionando Tris (pH 8), SDS, NaCl (5 M) y EDTA (0,5 M). El volumen adicionado de NaCl y EDTA se agrega dependiendo de la concentración de formamida que cada sonda requiere, según se detalla en las Tablas 9 y 12. Los filtros se incubaron a 48 °C en durante 15 min en tubos Falcon de 50 mL con el buffer pre-calentado. Los filtros se tiñeron con DAPI (sección 10.1.3) y se secaron. Finalmente se colocaron en portaobjetos, se adicionaron con solución 4:1 de Citifluor (Citifluor Ltd.) y Vecta Shield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA), respectivamente y se guardaron protegidos de la luz a -20 °C.

10.1.6. Cuantificación de microorganismos de suelo

La cuantificación se realizó en microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axiophot, AX10). Para cada muestra y por triplicado, un total de 600 a 800 células teñidas con DAPI se contaron para la determinación de microorganismos totales (abundancia). Asimismo, para cada sonda se contó al azar aproximadamente 15-20 campos correspondientes a 600-800 microorganismos teñidos con DAPI, empleando el filtro adecuado para el fluorocromo Cy3. Los resultados se expresaron como células g⁻¹ de suelo seco.

Tabla 11. Protocolo de preparación de la mezcla de hibridación según los porcentajes de formamida requeridos para cada sonda.

MEZCLA DE HIBRIDACIÓN		
REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (μl)
TRIS (pH 8.0)	1M	40
SDS	10%	2
NaCl	5M	360
FORMAMIDA*	35%	700
	10%	200
	5%	100
	0%	0
H ₂ O	Hasta ajustar el volumen final a 2 mL	

*La concentración de formamida a emplear se selecciona según la condición de hibridación requerida para cada sonda, tal como se indica en la Tabla 9

Tabla 12. Protocolo de preparación del buffer de lavado según los porcentajes de formamida requeridos para cada sonda.

BUFFER DE LAVADO					
REACTIVO	CONCENTRACIÓN		VOLUMEN (μl)		
TRIS (pH 8,0)	1M		1000		
SDS	10%		50		
FORMAMIDA	35%	NaCl (5M)*	700	EDTA 0,5M (pH 8,0)*	500
	10%		4500		-
	5%		6300		-
	0%		9000		-
H ₂ O	Hasta ajustar el volumen final a 50 mL				

*Los volúmenes de NaCl y EDTA a emplear se selecciona según la concentración de formamida requerida para cada sonda, tal como se indica en la Tabla 9.

10.2. Análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP)

El protocolo de T-RFLP usado correspondió al implementado por Morán, 2006 (Morán *et al.*, 2006) y se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Molecular y Biorremediación del Departamento de Genética Molecular y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Pontificia Universidad Católica de Chile. La Figura 20 muestra el protocolo general de T-RFLP.

10.2.1. Amplificación del gen 16S rRNA del DNA comunitario de suelo

Se realizó la amplificación del DNA extraído desde muestras de suelo mediante la reacción de PCR con los primers 8f (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'), marcado con el fluorocromo NED, y 1392r (5' ACG GGC GGT GTG TAC 3') diseñados para el gen 16S rARN del dominio *Bacteria* (Amann *et al.*, 1995), usando dos diluciones del DNA (1:20 y 1:50) y la muestra sin diluir, en triplicado.

En todos los tubos se tuvo un volumen final de 50 μ l, correspondiente a la mezcla de reacción, 1 μ l de la muestra de DNA a amplificar (muestra sin diluir o diluida) y agua calidad biología molecular estéril para completar el volumen de reacción. La reacción de PCR que se empleó se describe previamente (sección 8.4).

Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1,2% p/v) para visualizar la obtención de una banda de aproximadamente 1500 pb. A partir de éste se eligió la dilución a purificar y digerir, la cual correspondió a la dilución 1:50 de los triplicados.

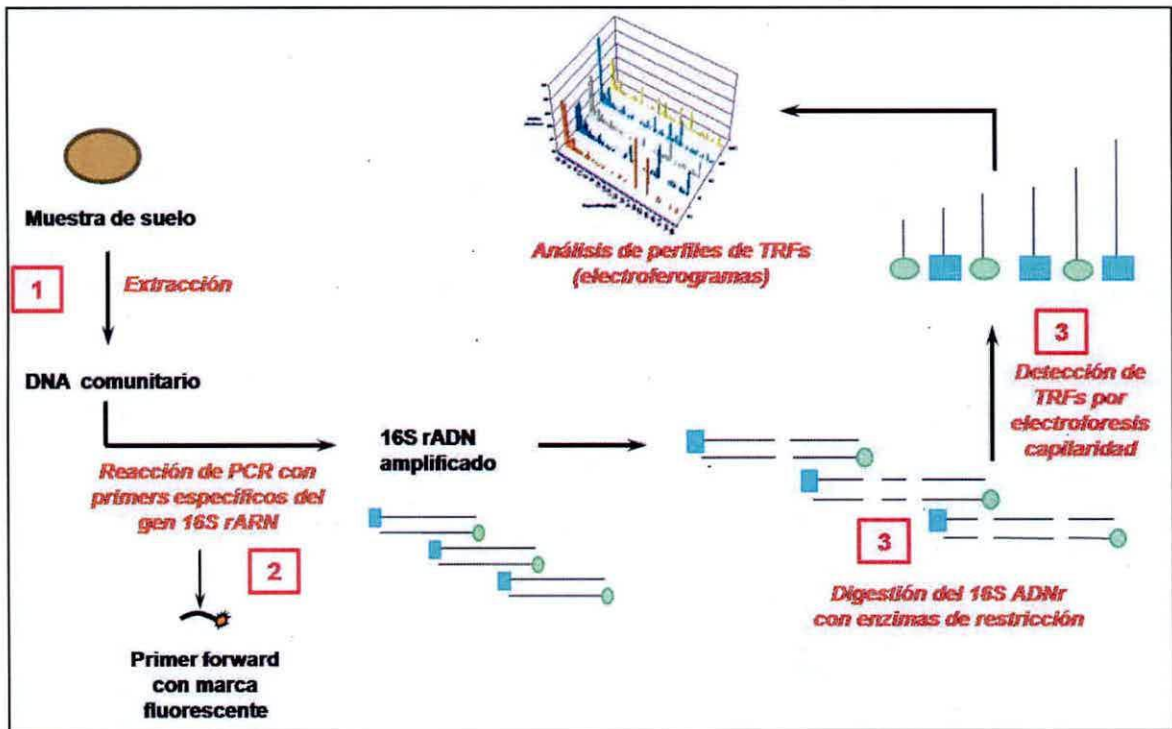


Figura 20. Esquema del protocolo general empleado para el análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP)

10.2.2. Purificación y cuantificación del DNA

La purificación de los productos de la reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el kit de purificación Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, WI), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La cuantificación del DNA obtenido se determinó por absorbancia como se describió previamente (sección 6.1.3.).

10.2.3. Digestión de los productos de PCR y electroforesis capilar

Para cada muestra, la digestión de los productos de PCR purificados se realizó de forma independiente con las enzimas *MspI* y *HhaI* (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un

Posteriormente, los fragmentos digeridos fueron lavados con etanol 70% (v/v), resuspendidos en 5 µl de agua milli-Q estéril y separados por electroforesis de capilaridad empleando un equipo ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems; Foster City, CA) en el servicio de genotipificación de la oficina de biotecnología de la Universidad de Iowa, USA (http://www.dna.iastate.edu/mainpage_genotype.html). El tamaño de los fragmentos terminales del 16S rDNA digerido se estimaron mediante el estándar interno ROX 1000.

10.2.4. Análisis de datos y estadística

Los datos obtenidos del electroferograma, fueron procesados para el análisis de estructura de comunidad. En primera instancia se empleó el programa Gene Scan View 1.2, que facilitó la lectura de los electroferogramas. Posteriormente, fue necesario redondear el tamaño de los fragmentos terminales de restricción (Terminal Restriction Fragments, TRFs), debido a que los largos entregados originalmente por el método de secuenciación corresponden a números decimales, producto del tiempo de migración de los distintos TRFs obtenidos. Su tamaño real debe corresponder a un número entero dado por la cantidad de pb que lo componen. Luego se debió eliminar los fragmentos cuyos tamaños fueran inferiores a 35 pb y mayores a 500, dado que el estándar empleado discrimina en el rango 30 - 500 pb, con mayor error en los extremos. Por último, los fragmentos que diferían entre sí en 2 pb fueron agrupados, debido a que el error del equipo corresponde a ± 2 pb. Esto se traduce en que la altura y el área asociado al largo de un TRF será la suma de aquellos fragmentos que pueden ser agrupados (Wang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007).

Para una interpretación más exhaustiva de las variaciones observadas en los perfiles generados por T-RFLP, se recurrió a un análisis estadístico multivariado mediante el programa Primer (Primer-E Ltd, Plymouth, UK), Estos análisis ayudan a agrupar conjuntos grandes de datos y a analizar de forma simultánea variables que constan de una gran complejidad. El programa permitió realizar matrices de similitud, análisis de clusters y test estadístico ANOSIM (un procedimiento multivariable al azar análogo al ANOVA) y análisis multivariable de los datos mediante el método NMDS ("No-Metric Dimensional Scaling"). El NMDS permite medir la similitud (o disimilitud) entre los TRFs obtenidos con la enzima de restricción *HhaI* para cada suelo en su conjunto, facilitando su

interpretación. El método de NMDS puede ser combinado con el análisis ANOSIM para proveer la diferencia de grupos (Clark y Gorley, 2006).

Asimismo, se empleó la herramienta bioinformática The T-RFLP Phylogenetic Assignment Tool (Kent *et al.*, 2003) para la construcción de perfiles taxonómicos mediante la "asignación" de phylum a las diferentes áreas (perfiles T-RFLP) obtenidos con las enzimas *MspI* and *HhaI* (Morán *et al.*, 2006), por ejemplo, en estudios de comunidades microbianas.

11. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos de los microcosmos fue realizado en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) con ayuda del Dr. Marcos Méndez. Los resultados del trabajo experimental fueron analizados mediante un análisis de varianza para muestras repetidas (ANOVA), a un nivel de significancia (p) de 5%, mediante el programa SYSTAT v6.1 para Windows.

RESULTADOS

U. T. F. S. M.
BIBLIOTECA CENTRAL

VI. RESULTADOS

1. Caracterización de la bacteria *Pseudomonas* sp. MHP41

Para la identificación más exacta de los microorganismos y su diferenciación es necesario recurrir a técnicas moleculares basadas en marcadores genéticos como el gen ribosómico 16S rRNA. La caracterización y comparación de la cepa MHP41 respecto de la cepa modelo degradadora de atrazina *Pseudomonas* sp. ADP se realizó mediante la técnica ARDRA con las enzimas de restricción *MspI* y *HhaI*.

La cepa MHP41, aislada de suelos agrícolas de la Región de Valparaíso, es una bacteria Gram-negativa degradadora de s-triazinas, móvil y forma colonias redondas, lisas y convexas cuando crece en placas de agar.

Los perfiles electroforéticos de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA digerido con las endonucleasas (*MspI* y *HhaI*) y obtenidos para cada cepa, se muestran en la Figura 21. El análisis ARDRA mostró diferencias importantes en el patrón de restricción del gen 16S rRNA entre ambos microorganismos permitiendo determinar que las cepas *Pseudomonas* sp. MHP41 y ADP son ribotipos diferentes.

Los resultados aquí descritos¹, en conjunto con otros obtenidos previamente en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental (UTFSM) permitieron identificar a la cepa MHP41 como *Pseudomonas* sp. y diferenciarla de la cepa *Pseudomonas* sp. ADP.

¹ Estos resultados contribuyeron a la siguiente publicación científica: Hernández, M., P. Villalobos, V. Morgante, M. González, C. Reiff, E. Moore and M. Seeger. (2008) Isolation and characterization of a novel simazine-degrading bacterium from Chilean agricultural soils, *Pseudomonas* sp. MHP41. *FEMS Microbiol Lett.* 286: 184-190.

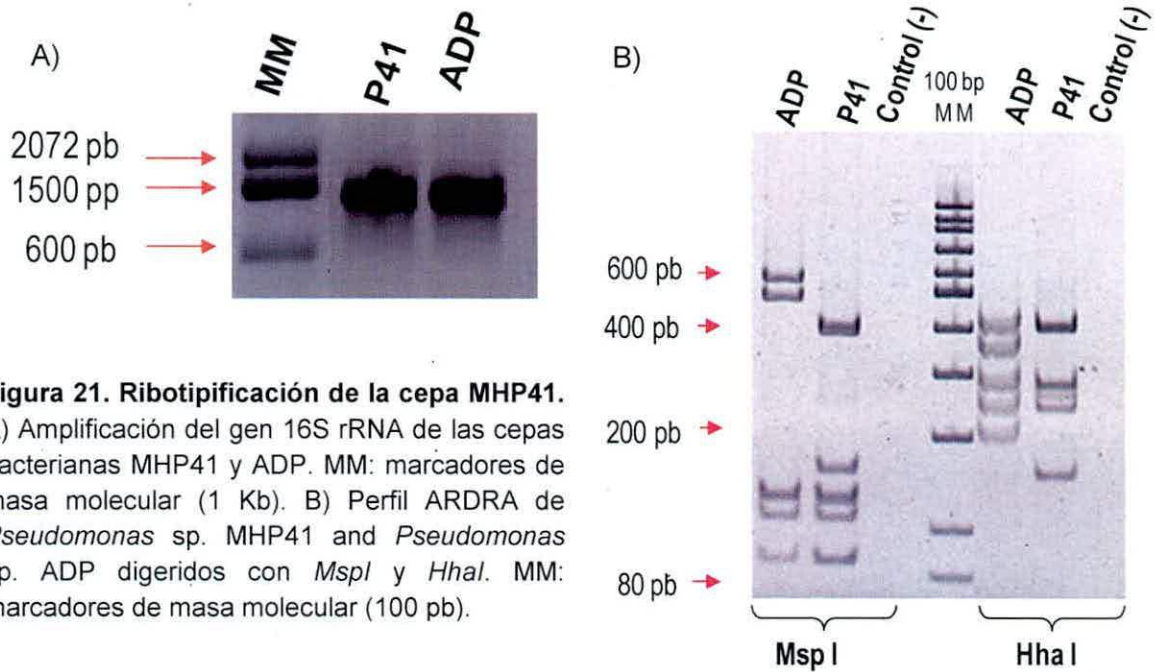


Figura 21. Ribotipificación de la cepa MHP41.
 A) Amplificación del gen 16S rRNA de las cepas bacterianas MHP41 y ADP. MM: marcadores de masa molecular (1 Kb). B) Perfil ARDRA de *Pseudomonas* sp. MHP41 and *Pseudomonas* sp. ADP digeridos con *MspI* y *HhaI*. MM: marcadores de masa molecular (100 pb).

2. Caracterización de suelos agrícolas

Para los ensayos de biorremediación se colectaron dos tipos de suelos agrícolas del Valle de Quillota, Región de Valparaíso (Fig. 22).

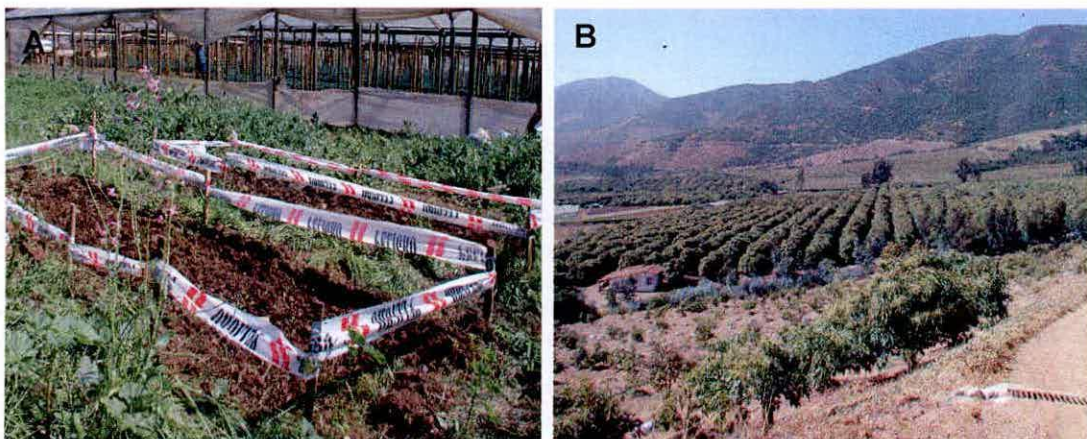


Figura 22. Zonas de muestreo de los suelos agrícolas, en la provincia de Quillota. A) Zona de muestreo en terreno aledaño a invernaderos de claveles. B) Vista general del cultivo de paitos.

La Tabla 13 resume las propiedades físico-químicas y el historial agrícola de cada tipo de suelo. Esto sí son resultados. Las principales diferencias entre los suelos estudiados son el historial de aplicación de herbicidas, el contenido de materia orgánica y la textura. Ambos tipos de suelo presentan un pH neutro y una relación carbono:nitrógeno (C/N) similar.

Tabla 13. Propiedades físico-químicas e historia agrícola de cada tipo de suelo.

Suelo	Tamaño partículas (%)			Textura	C (g kg ⁻¹)	N (g kg ⁻¹)	C/N	pH (H ₂ O)	Materia orgánica (%)	Tipo cultivo	Simazina (tratamiento)
	Arcilla	Limo	Arena								
A ⁽¹⁾	29,3	30,0	40,7	franco-arcilloso	20,3	1,8	11,5	7,2	3,5	huerta y flores, rotativo	nunca
B ⁽²⁾	10,7	40,7	48,6	franco	25,6	2,0	12,8	6,4	8,5	palta, continuo	anual

(1) Laboratorio de Suelos y Análisis Foliar. Facultad de Agronomía, PUCV, Quillota, Chile.

(2) Dr. Edward Moore. Macaulay Land Use Research Institute, Aberdeen, Escocia.

Existen diferentes métodos para estimar el número de microorganismos presentes en el suelo. Los métodos más empleados se agrupan en dos grandes categorías: los que se basan en recuentos directos mediante el uso de microscopios (tinción con compuestos de afinidad a ácidos nucleicos, colorantes vitales, etc.) y aquellos que se basan en el cultivo de microorganismos (recuento de bacterias viables en placa, número más probable, etc). En esta tesis, la estimación de la abundancia total de microorganismos en el suelo se realizó mediante tinción con DAPI (compuesto químico de alta afinidad al DNA) mientras que el número de heterótrofos cultivables se estimó mediante el recuento en placa de TSA. En general, no se observaron variaciones significativas en el número total de microorganismos entre el suelo tipo A y B (la abundancia de microorganismos en el suelo A es de $1,53 \pm 0,31 \times 10^{10}$ cel g⁻¹, mientras que en el suelo B es de $2,11 \pm 0,21 \times 10^{10}$ cel g⁻¹). A pesar de que ambos tipos de suelos mostraron una abundancia de microorganismos semejante, el suelo A se diferencia del suelo B por un orden de magnitud en el recuento de heterótrofos cultivables ($8,26 \pm 0,21 \times 10^5$ UFC g⁻¹ en el suelo A y $4,5 \pm 0,58 \times 10^6$ UFC g⁻¹ en el suelo B).

3. Estudios de adsorción de simazina en suelos agrícolas

El destino de un herbicida en el suelo depende en parte relevante de las interacciones con la fracción sólida del suelo. Estas interacciones son de carácter físico-

químicas, dependientes del tipo de herbicida y de las características del suelo y corresponden principalmente a procesos de adsorción. El método comúnmente empleado para este tipo de estudio es la creación de isothermas de adsorción y posteriormente el análisis de las mismas mediante el modelo lineal y el modelo de Freundlich.

Inicialmente, se obtuvieron las isothermas de adsorción para el suelo A y B, respectivamente. Las isothermas se construyeron graficando las concentraciones de simazina en solución versus las concentraciones de simazina en suelo para ambos suelos agrícolas, obtenidas desde experimentos tipo batch empleando concentraciones iniciales de simazina en las soluciones de 100, 50, 20, 10, 5 y 2 ppm. El equilibrio de adsorción o isoterma se establece cuando la concentración de contaminante remanente en la solución se encuentra en equilibrio con la concentración en la superficie del sólido a una temperatura constante. (Figura A1, Anexo I).

La Figura A2, en el Anexo I, muestra algunas de las regresiones realizadas para obtener los valores de K_d en suelos tipo A y B según el modelo lineal. Las regresiones mostradas se seleccionaron para cubrir el mayor rango de horas en las que se realizó el ensayo. La Tabla A1 (Anexo I) resume los valores obtenidos para el coeficiente de distribución K_d de simazina en los suelos estudiados. Se indican también los valores del ajuste de las regresiones lineales. La Figura A3 (Anexo I) muestra algunas de las regresiones realizadas para obtener los valores de K_f en suelos A y B según el modelo de Freundlich. Al igual que para el modelo lineal, las regresiones mostradas se seleccionaron para cubrir el mayor rango de horas en las que se realizó el ensayo. En la Tabla A2 (Anexo I) se muestran los valores obtenidos para el coeficiente de distribución K_f de simazina en los suelos estudiados, según el ajuste del modelo de Freundlich. Se indican también los valores de n y los valores para las regresiones lineales.

La Tabla 14 resume los valores de K_d , R^2 , K_f y n determinados para la adsorción de simazina en los suelos A y B a las 24 h, respectivamente. Se puede observar que los coeficientes de distribución estimados para simazina según el modelo lineal (k_d) son menores en el suelo A. Esto indicaría que simazina es retenida en menor medida por estos suelos, debido probablemente a sus características físico-químicas. De igual forma, coeficientes de distribución según el modelo de Freundlich (K_f) son menores para suelo A. También se observa que los valores de n son distintos de 1, lo que impide hacer comparaciones directas entre los coeficientes calculados según este modelo y según el modelo lineal. Valores de n

menores a la unidad indican que es retenida en suelo y que la adsorción es dependiente de la concentración inicial del compuesto en solución.

Tabla 14. Coeficientes y parámetros determinados a las 24 horas para los modelos Lineal y Freundlich que describen la adsorción de simazina en los dos tipos de suelos agrícolas estudiados.

	Modelo Lineal		Modelo de Freundlich	
	K_d (L kg ⁻¹)	R ²	K_f (L kg ⁻¹)	n
Suelo A	7.74	0.98	1.63	0.58
Suelo B	9.32	0.97	1.96	0.66

Los K_{OC} determinados para simazina en suelo con y sin historial de aplicación de herbicidas fueron de 193 (L kg⁻¹) y de 300 (L kg⁻¹), respectivamente. Estos valores indicarían que la adsorción de simazina en ambos tipos de suelo es de carácter moderada.

Posteriormente, para estimar la entalpía de adsorción de simazina se realizaron isotermas de adsorción a dos temperaturas diferentes (Figura A4 y Tabla A3, Anexo I). Los valores de entalpía de adsorción obtenidos para el suelo A y B fueron de -11,50 (kJ mol⁻¹) y de -21,06 (kJ mol⁻¹), respectivamente. Estos valores indicarían que el tipo de adsorción de simazina en ambos suelos es un proceso gobernado por interacciones físicas del tipo puentes de hidrógeno (Navarro-García, 1992; DiVincenzo, 1997). La adsorción del tipo física es un proceso rápido y usualmente reversible debido al bajo requerimiento energético.

Estos resultados en su conjunto muestran que en los suelos estudiados, la adsorción de simazina es un proceso exotérmico gobernado por enlaces tipo puentes de hidrógeno. En el caso del suelo A (suelo franco-arcilloso) la adsorción de simazina se debe principalmente a interacciones con la fracción arcillosa mientras que en el suelo tipo B (franco) a interacciones con la materia orgánica (Flores *et al.*, 2008)².

² Estos resultados contribuyeron a la siguiente publicación científica: Flores, C., V. Morgante, M. González, R. Navía, and M. Seeger. 2008. Adsorption studies of the herbicide simazine in agricultural soils of Aconcagua valley, central Chile. *Chemosphere*, doi:10.1016/j.chemosphere.2008.10.060. *In press*.

La inmovilización de la cepa MHP41 en matriz de alginato fue la estrategia de protección del inóculo estudiada en ésta tesis (Fig. 23).

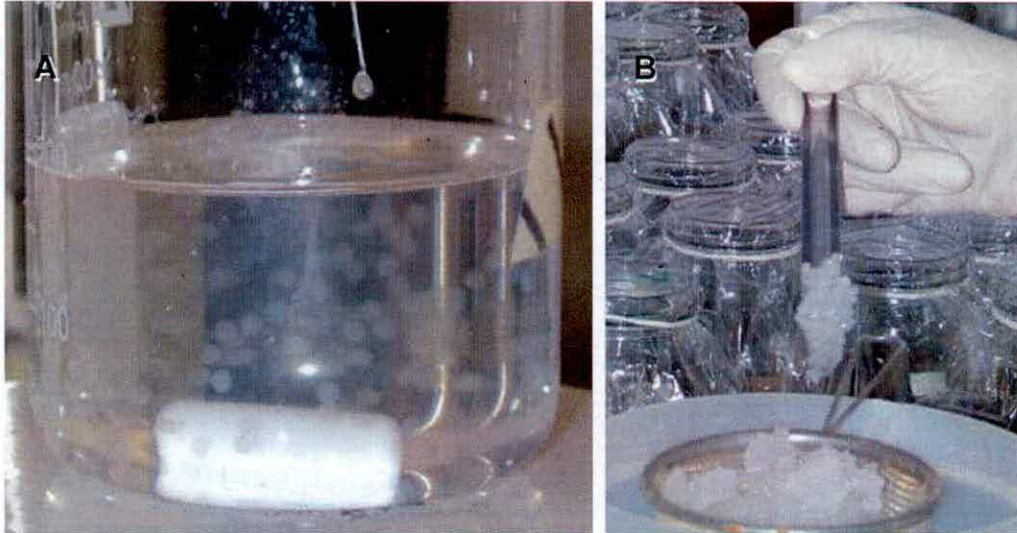


Figura 23. Células de la bacteria *Pseudomonas* sp. MHP41 inmovilizadas en matriz de alginato. A) Proceso de formación de cápsulas de alginato de sodio con bacterias al caer en solución de CaCl_2 agitado. B) Las cápsulas de alginato que contienen las células se escurren y se inoculan en los microcosmos de suelo.

Para evaluar si la inmovilización de la cepa MHP41 en cápsulas de alginato afecta el crecimiento y capacidad de degradación de simazina, se diseñaron experimentos de viabilidad y de remoción de simazina.

La matriz de alginato de sodio preservó la viabilidad celular y promovió el crecimiento de la cepa MHP41 (Fig. 24A). Después de 48 h de incubación, se observó un aumento de más de dos órdenes de magnitud en el recuento de células bacterianas (UFC mL^{-1}).

La degradación de la simazina por células inmovilizadas fue estudiada mediante HPLC. Células encapsuladas de la cepa MHP41 fueron capaces de degradar la simazina en medio líquido (Fig. 24B). El 90% de la simazina fue eliminado en las primeras 6 h del ensayo.

permite la libre difusión de nutrientes y oxígeno hacia las células inmovilizadas. La degradación de la simazina por células inmovilizadas fue estudiada mediante HPLC. Células encapsuladas de la cepa MHP41 fueron capaces de degradar la simazina en medio líquido (Fig. 24B). El 90% de la simazina fue eliminado en las primeras 6 h del ensayo.

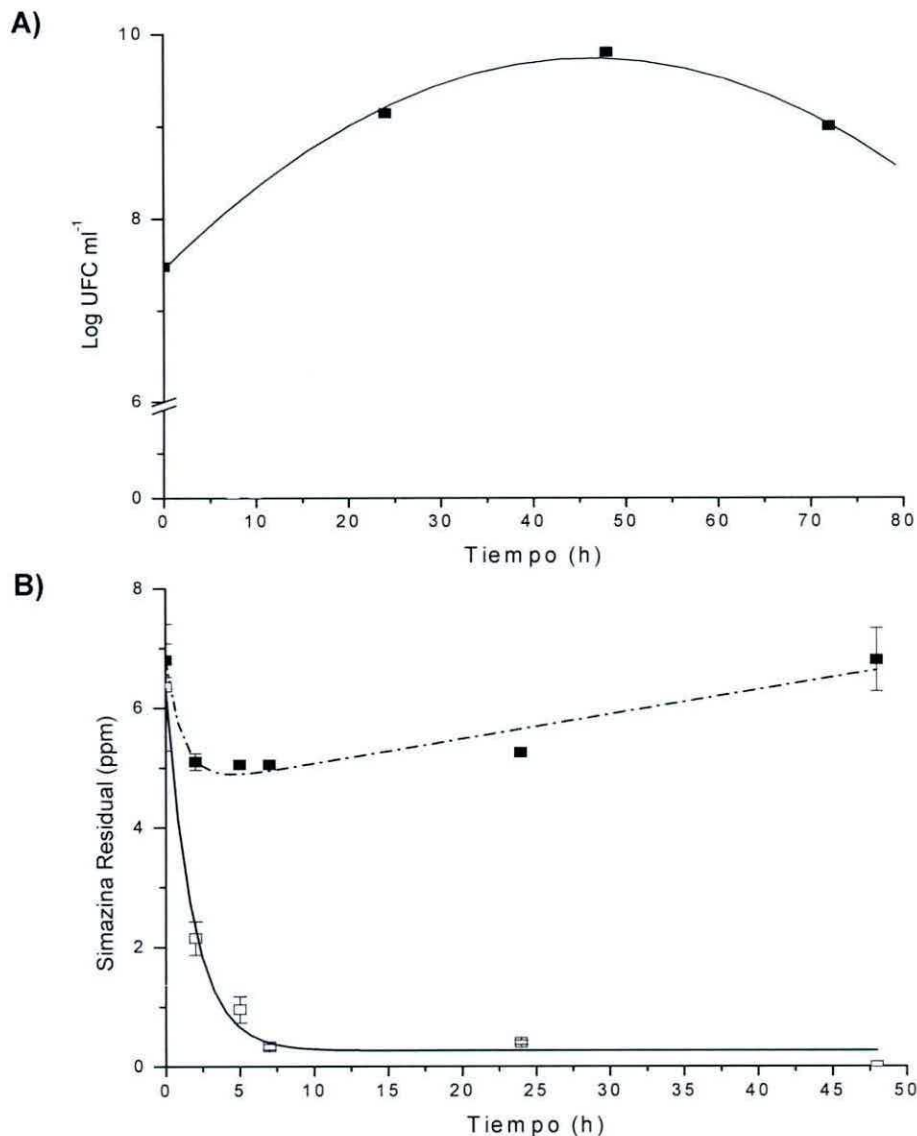


Figura 24. Viabilidad y degradación de simazina por *Pseudomonas* sp. MHP41 inmovilizada. A) Viabilidad de la cepa MHP41 encapsulada. Las cápsulas fueron crecidas en MM con simazina (0,5mM). Las UFC mL⁻¹ fueron determinadas en medio TSA. B) Remoción de simazina por la cepa MHP41 inmovilizada. La concentración de simazina se cuantificó por HPLC. En línea punteada, tratamiento *control* (cápsulas de alginato estéril). En línea sólida, tratamiento *inoculado* (células de la cepa MHP41 encapsuladas). Cada punto es un promedio de tres experimentos independientes.

En el tratamiento *control* se observó una leve disminución en la concentración de simazina a las 6 h. Sin embargo, el total de simazina adicionada al medio al inicio del experimento fue detectada a las 48 h. Esto indica que el alginato no participa en la remoción de la simazina.

Estos resultados permitieron concluir que el proceso de inmovilización de *Pseudomonas* sp. MHP41 en matriz de alginato no disminuye su viabilidad ni su capacidad de degradación de simazina.

5. Bioaumentación con la cepa bacteriana MHP41 en microcosmos de suelo

Para determinar la capacidad de *Pseudomonas* sp. MHP41 de remediar suelos tratados con simazina, se emplearon microcosmos de los suelos agrícolas descritos anteriormente (Fig. 25). La bioaumentación con la cepa bacteriana MHP41 se realizó con células inmovilizadas en alginato de sodio (Fig. 23).



Figura 25. Microcosmos de suelo agrícola tipo A empleados en los estudios de biorremediación. A) Montaje del set de microcosmos. B) Imagen de un microcosmos conteniendo el suelo tamizado.

5.1. Suelos agrícolas sin historial de aplicación de herbicidas

La Tabla 7 muestra cada uno de los tratamientos y su respectiva nomenclatura en los ensayos de microcosmos con suelos tipo A. Este suelo se trató con dos dosis del herbicida: 100 ppm para analizar condiciones de alta concentración (tratamientos I y II) y ~13 ppm, simulando las condiciones de aplicación de simazina en el campo (tratamientos III y IV).

La Figura 26 muestra la atenuación de simazina en suelo tratado con simazina a 100 ppm. No se observó atenuación natural del contaminante. La bioaumentación con bacterias encapsuladas fue exitosa, con la completa remoción del compuesto al cabo de 28 d (>98%). En este tratamiento, el tiempo de vida media de la simazina fue de 14 d con una velocidad de remoción de simazina (μ) de 4,15 ppm d⁻¹. Por lo tanto, la bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 inmovilizada fue esencial para la remoción del herbicida aplicado a altas concentraciones.

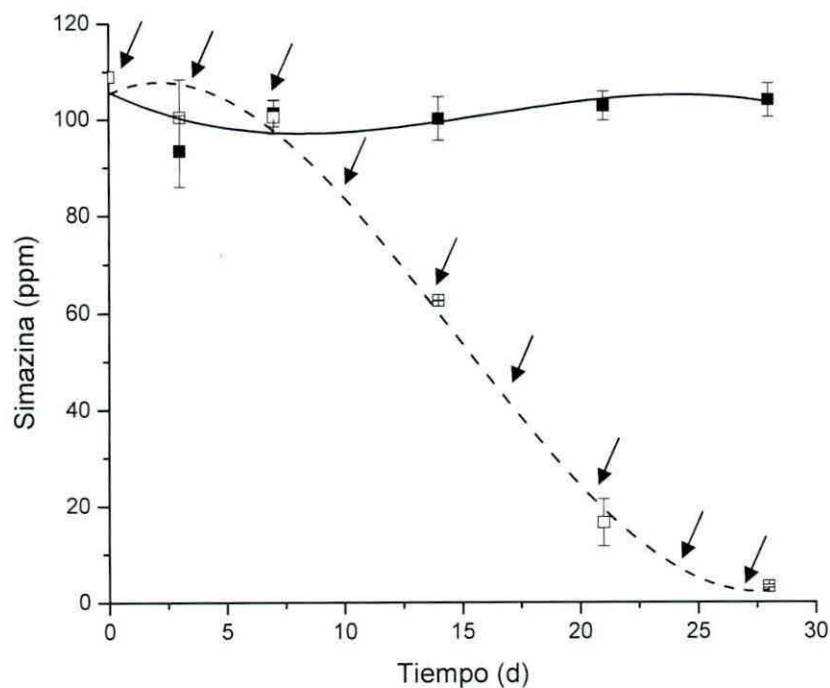


Figura 26. Efecto de la bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 inmovilizada sobre la atenuación de simazina en suelo agrícola sin historial de aplicación de simazina. El suelo fue tratado con 100 ppm. Línea sólida, tratamiento no inoculado. La línea punteada, tratamiento inoculado con la cepa MHP41. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. Las flechas indican los puntos de inoculación.

La degradación de un herbicida depende, entre otros factores, de la actividad microbiana, las condiciones ambientales y de la presencia de sustratos. Para estimar el número de microorganismos degradadores de simazina presentes en el suelo se utilizó el método de número más probable (NMP). Este método permite determinar la actividad catabólica de microorganismos degradadores de simazina (ACDS) (Dinamarca *et al.*, 2007).

La Figura 27 muestra efecto de la bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 sobre la ACDS en suelo tipo A tratado con 100 ppm de simazina. Se observó que en suelos controles la ACDS es muy baja. La bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 incrementó en forma significativa la ACDS. La adición de bacterias encapsuladas, incrementa la ACDS a partir de la primera semana, llegando a niveles máximos a partir de la segunda semana. Estos niveles altos de ACDS se mantienen hasta el final del experimento ($p < 0,05$).

El incremento de la ACDS en los microcosmos bioaumentados se correlaciona con la atenuación de simazina observada en estos microcosmos (Fig 26). En suelos control donde no se observó degradación de simazina, la actividad metabólica de simazina en los suelos fue baja.

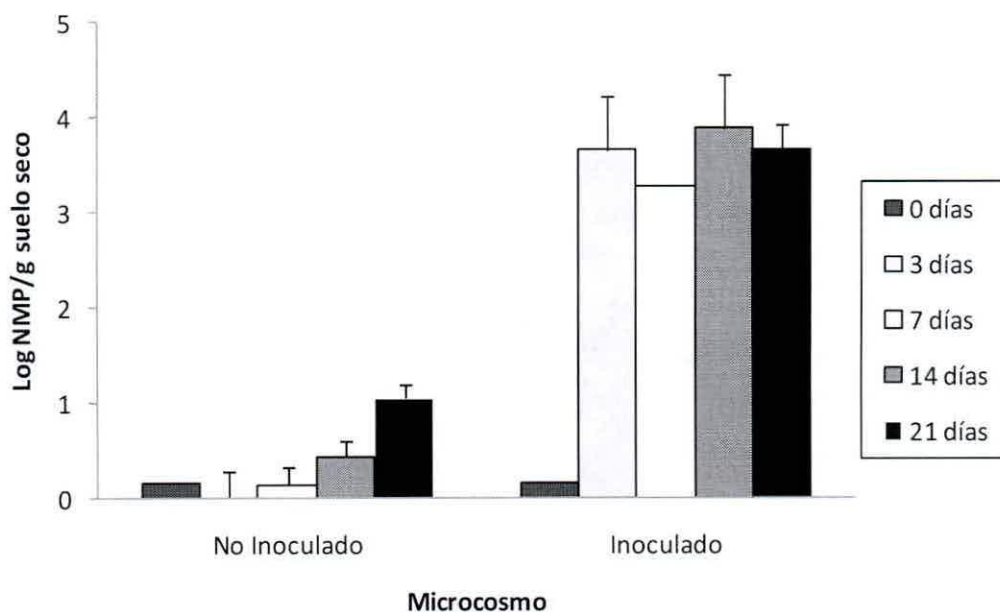


Figura 27. Estimación de la ACDS en microcosmos de suelo sin historial tratados con simazina (100 ppm). Se muestran tratamientos no inoculados e inoculados con *Pseudomonas* sp. MHP41. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

En una segunda etapa, se estudió el efecto de la bioaumentación en suelo sin historial de aplicación de simazina tratados con concentraciones de simazina similares a la aplicada en las prácticas agrícolas (~13 ppm). Se observó una remoción natural del contaminante que alcanza el 56% a los 28 d de experimentación ($\mu = 0,2 \text{ ppm d}^{-1}$). La inoculación de la cepa MHP41 encapsulada acelera la degradación del herbicida ($\mu = 0,4 \text{ ppm d}^{-1}$), con un tiempo de vida media de 5 d. En tratamientos bioaumentados el remanente de simazina al cabo de 28 d es de 4% (Fig. 28A).

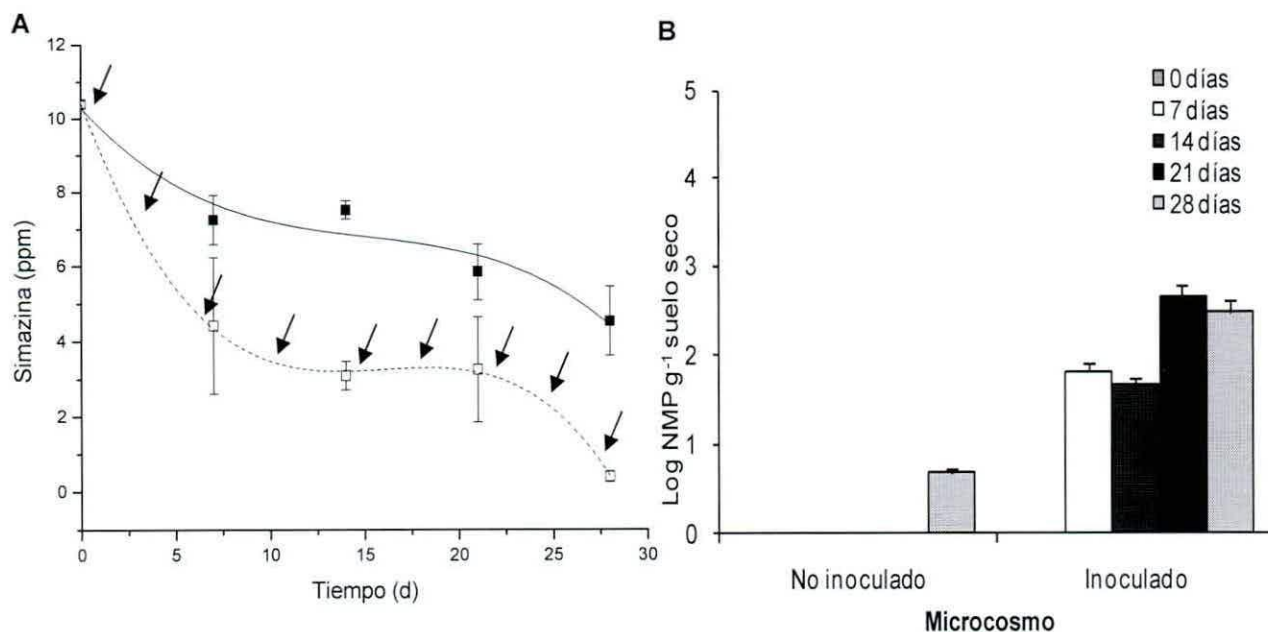


Figura 28. Efecto de la bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 inmovilizada sobre la atenuación de simazina y la ACDS en suelo agrícola sin historial de aplicación de simazina. El suelo fue aplicado con concentraciones de simazina similares a las prácticas agrícolas (~13 ppm). A) La remoción de simazina se cuantificó por HPLC. Línea sólida, tratamiento no inoculado. La línea punteada, tratamiento inoculado con *Pseudomonas* sp. MHP41. B) La ACDS se determinó mediante NMP. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. Las flechas indican los puntos de inoculación.

El efecto de la bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 sobre la actividad catabólica degradadora de simazina se estudió también en suelo tipo A contaminado con simazina a baja dosis (~13 ppm). Al igual que en los experimentos previos, la ACDS es baja en los suelos no inoculados (Fig. 28B). La bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41

incrementa la ACDS a partir de la primera semana y a lo largo del período de experimentación ($p < 0,05$).

En consecuencia, este estudio demostró que la bioaumentación con la cepa nativa de *Pseudomonas* sp. MHP41 fue exitosa en suelos sin adaptación previa a simazina. La remoción de simazina mediada por esta cepa es menos significativa cuando simazina fue aplicada en bajas concentraciones.

5.2. Suelos agrícolas con historial de aplicación de herbicidas

Se estudió el efecto de la bioaumentación con la cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. MHP41 sobre procesos de biodegradación de simazina en suelos tipo B. Este suelo se trató con una dosis del herbicida que simula las condiciones de aplicación de simazina en el campo (~13 ppm). La Tabla 8 muestra cada uno de los tratamientos y su respectiva nomenclatura en ensayos de microcosmos en suelos tipo B.

En suelo con historial de aplicación de simazina se observó una atenuación natural del contaminante que alcanza el 50% de remoción a los 10 d (Fig. 29). La velocidad de remoción de simazina (μ) es de 0,447 ppm d⁻¹. La bioaumentación aumenta la velocidad de remoción de simazina ($\mu = 0,786$ d⁻¹). Al cabo de 28 d la simazina es completamente removida en ambos tratamientos (>99%).

La estimación de la ACDS para el suelo con historial de aplicación de simazina se muestra en la Figura 30. Se observó que la microbiota nativa del suelo es activa en el catabolismo de simazina desde la primera semana de experimentación, y esta actividad catabólica aumenta con el tiempo. La adición de *Pseudomonas* sp. MHP41 al suelo elevó la ACDS en fases tempranas del ensayo.

Los resultados obtenidos demuestran que la adaptación previa de la microbiota al compuesto simazina es importante en el proceso de biodegradación natural.

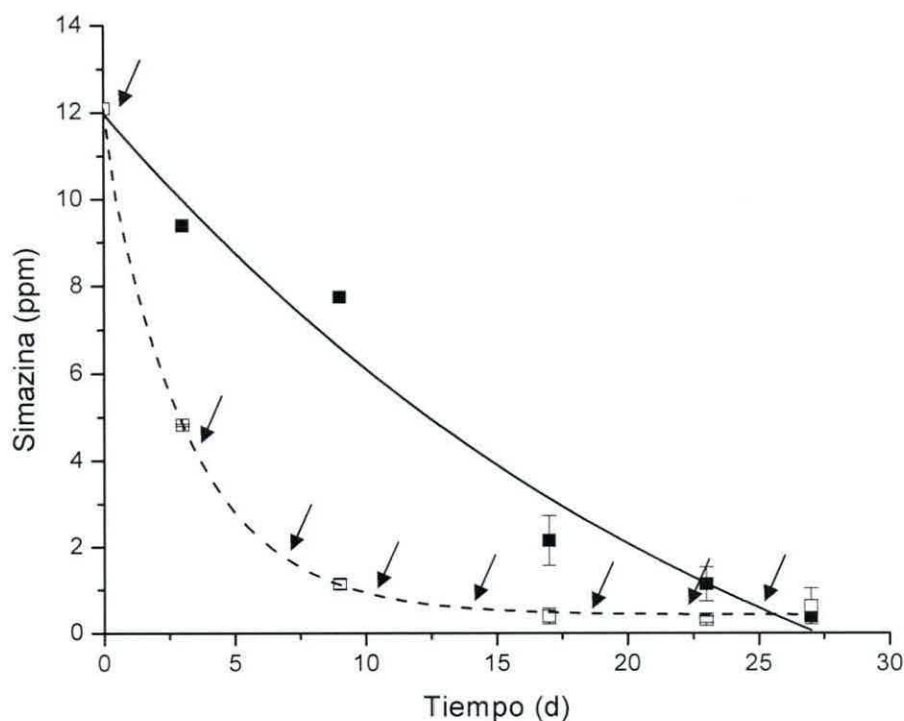


Figura 29. Efecto de la bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 inmovilizada sobre la atenuación de simazina en suelo con historial de aplicación de simazina. El suelo fue tratado con concentraciones de simazina similares a las prácticas agrícolas (~13 ppm). Línea sólida, tratamiento no inoculado. Línea punteada, tratamiento inoculado con *Pseudomonas* sp. MHP41. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. Las flechas indican los puntos de inoculación.

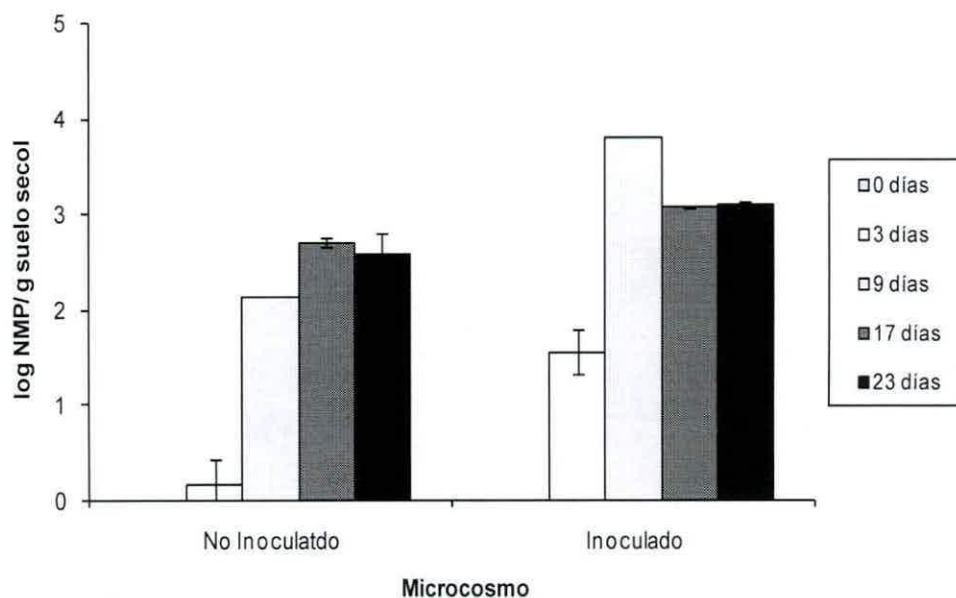


Figura 30. Estimación de la ACDS de simazina en microcosmos de suelo con historial tratado con simazina (13 ppm) durante experimentos de bioaumentación. Se muestran los tratamientos no inoculado e inoculado con *Pseudomonas* sp. MHP41. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

6. Efecto de la perturbación de la microbiota y la presencia de plantas sobre la biodegradación de simazina en suelos

Adicionalmente, durante experimentos de bioaumentación en suelos tipo B, se estudiaron otros factores que, se ha descrito, cumplen un rol fundamental en la remoción del contaminante. En estos estudios se analizó la atenuación de simazina y la ACDS en función de la microbiota nativa del suelo y las plantas.

6.1. Efecto de la perturbación de la microbiota nativa sobre la atenuación de simazina

Con el fin de estudiar el rol de la microbiota nativa en la remoción del herbicida simazina, un nuevo set de microcosmos fue diseñado empleando suelo tipo B perturbado en su carga microbiana. Para ello, el suelo agrícola se sometió irradiación gamma. En este proceso se aplicaron tres dosis de 25 kGy. La Tabla 8 muestra cada uno de los tratamientos y su respectiva nomenclatura en ensayos de microcosmos con suelo tipo B. Asimismo, en estos suelos también se estudió el efecto de la bioaumentación con la cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. MHP41 y el efecto de plantas de maíz en la remoción de la simazina. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes.

El recuento de heterótrofos cultivables en los suelos perturbados muestra que el proceso de irradiación logró una disminución mayor a un orden de magnitud ($2,8 \times 10^5$ UFC g^{-1}) respecto a los suelos no perturbados ($6,8 \times 10^6$ UFC g^{-1}). Luego de 28 d se observó un incremento de las bacterias heterótrofas cultivables, fenómeno que se traduce en la recuperación de la microbiota de los suelos (el recuento de heterótrofos cultivables incrementó desde $2,8 \times 10^5$ UFC g^{-1} a $1,7 \times 10^6$ UFC g^{-1}).

En los microcosmos con suelo perturbado se observó atenuación natural de simazina (Fig. 31). Dicha atenuación fue menor a la registrada en suelo no perturbado (Fig. 29). La presencia de plantas de maíz acelera la remoción del compuesto. En ambos casos se observó un remanente del compuesto superior al 30% al cabo de 28 d. La inoculación con *Pseudomonas* sp. MHP41 incrementó la atenuación de simazina ($p < 0,05$) evidenciando una

remoción superior al 85%. La permanencia de simazina en el suelo se puede asociar al proceso de perturbación. Esto puede deberse a dos causas principales, la eficiencia de la microbiota nativa se vio alterada y/o, a que la irradiación pudo afectar las características del suelo y aumentar la adsorción de simazina al suelo.

En relación a la estimación de la ACDS, en los microcosmos control no se detectó ACDS hasta la tercera semana de experimentación. En suelo perturbado, la inoculación con *Pseudomonas* sp. MHP41 incrementa notoriamente la ACDS desde el tercer día de inoculación. En presencia de plantas solo se observó un aumento de la ACDS desde la segunda semana de experimentación (Fig. 32).

Los resultados obtenidos muestran el rol principal de la microbiota nativa en los suelo tipo B. El historial de aplicación de herbicidas determina la actividad metabólica de la microbiota en la degradación del simazina.

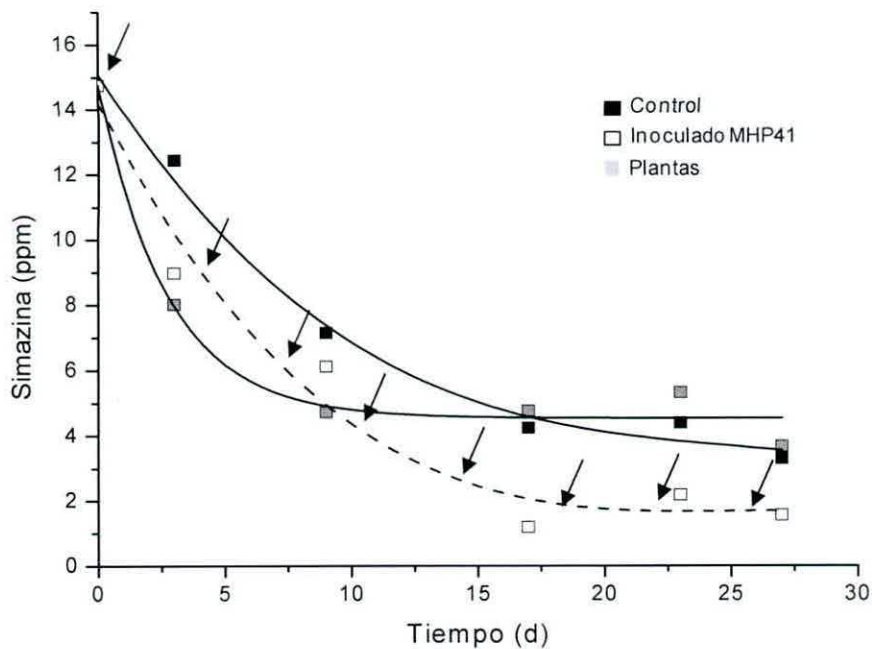


Figura 31. Efecto de la perturbación de la microbiota nativa sobre la degradación de simazina en suelo durante estrategias de bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes. Las flechas indican los puntos de inoculación.

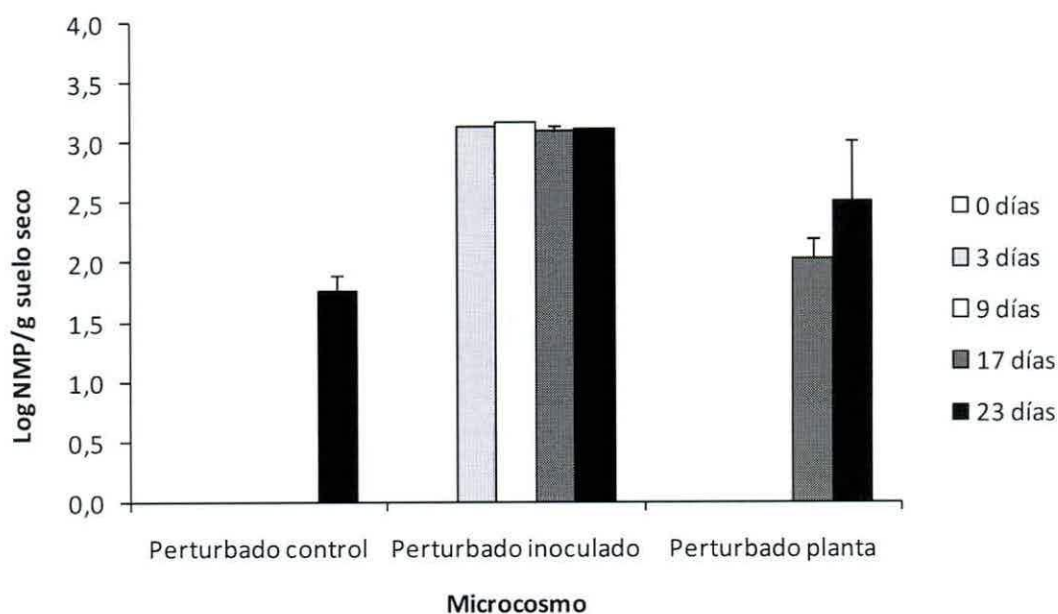


Figura 32. Estimación de la actividad de microorganismos degradadores de simazina en suelo con historial de aplicación de simazina perturbado mediante irradiación gamma. Se muestran los tratamientos control, inoculado con MHP41 y presencia de plantas. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

6.2. Rol de la presencia de plantas en procesos de biorremediación

Con el fin de estudiar el efecto de la presencia de plantas en la remoción del herbicida simazina en el suelo tipo B, plántulas esterilizadas de maíz fueron incorporadas a los microcosmos. Se cuantificó la concentración de simazina y se determinó la ACDS en el suelo (tratamiento X, según la Tabla 8). Algunas plantas poseen la capacidad fisiológica y bioquímica para eliminar, absorber o transformar sustancias xenobióticas a formas menos tóxicas. Un ejemplo lo constituye la biotransformación de atrazina o simazina mediada por plantas de maíz que presentan una tolerancia natural a estos compuestos (Shimabukuro *et al.*, 1970).

El efecto de la presencia de plantas en la remoción del herbicida simazina se observa en la Figura 33. En suelos con historial de aplicación del compuesto, la presencia de plantas no acelera la atenuación del simazina respecto a la bioaumentación con la cepa MHP41 ($\mu = 0,573 \text{ ppm d}^{-1}$ vs $\mu = 0,786 \text{ ppm d}^{-1}$, respectivamente). Luego de 28 d de experimentación, simazina fue removida completamente en todos los tratamientos.

Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en la estimación de microorganismos degradadores de simazina (Fig. 34). La ACDS en microcosmos con plantas es semejante a la actividad de la microbiota nativa de suelo control mientras que en el suelo bioaumentado, la ACDS es mayor.

Los resultados indican que en suelos agrícolas con historial de aplicación de simazina la atenuación natural es responsable de la remoción de la mayor parte del herbicida. No obstante, la adición de la cepa MHP41 es una estrategia de biorremediación más eficiente que la presencia de plantas.

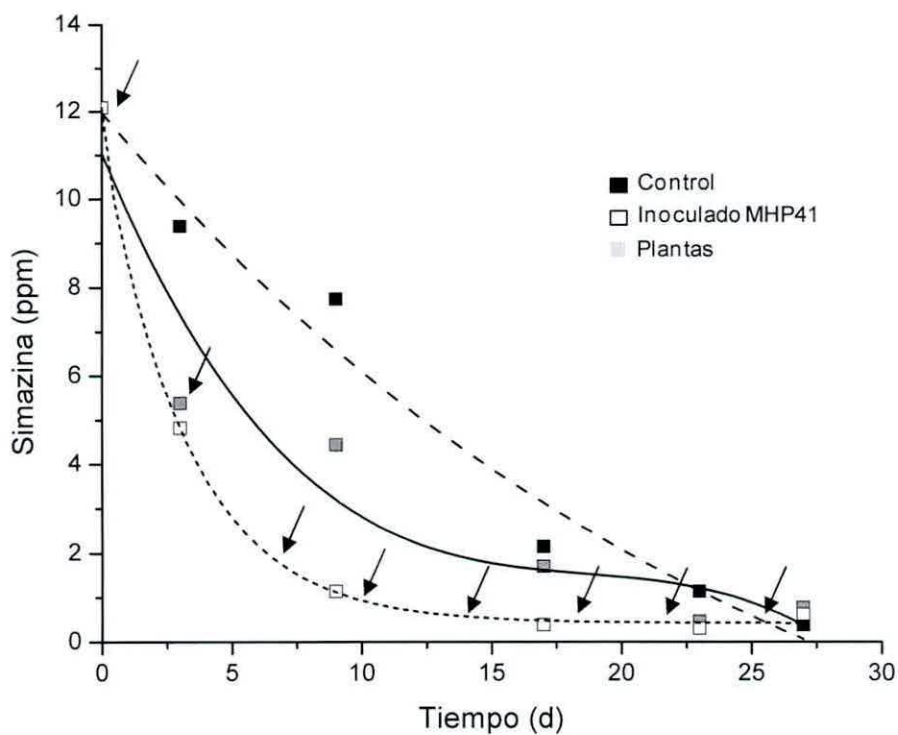


Figura 33. Efecto de la presencia de plantas en la remoción del herbicida simazina, en microcosmos de suelo tipo B. Símbolos negros, tratamiento control. Se muestran los tratamientos control, inoculado y con plantas (sin bioaumentar). Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes. Las flechas indican los puntos de inoculación.

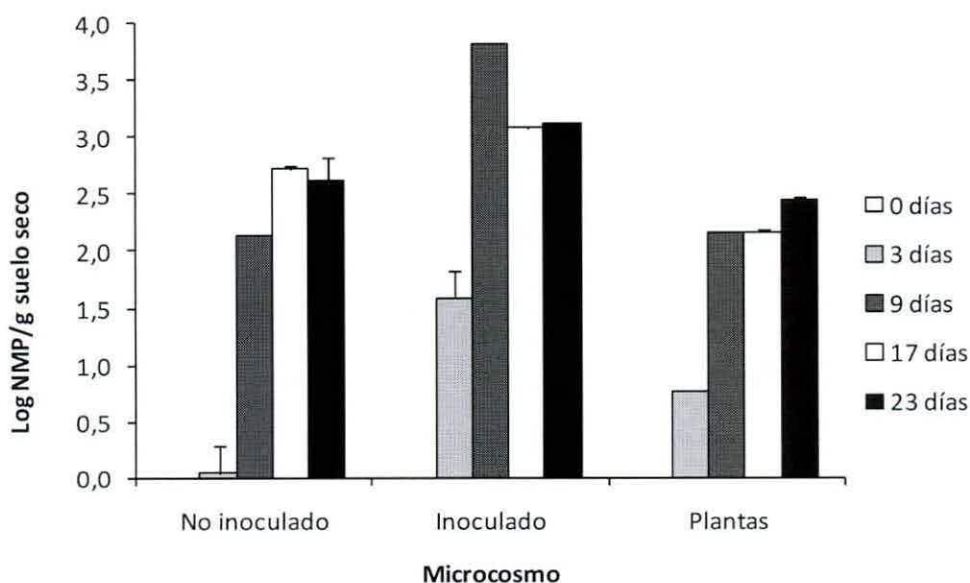
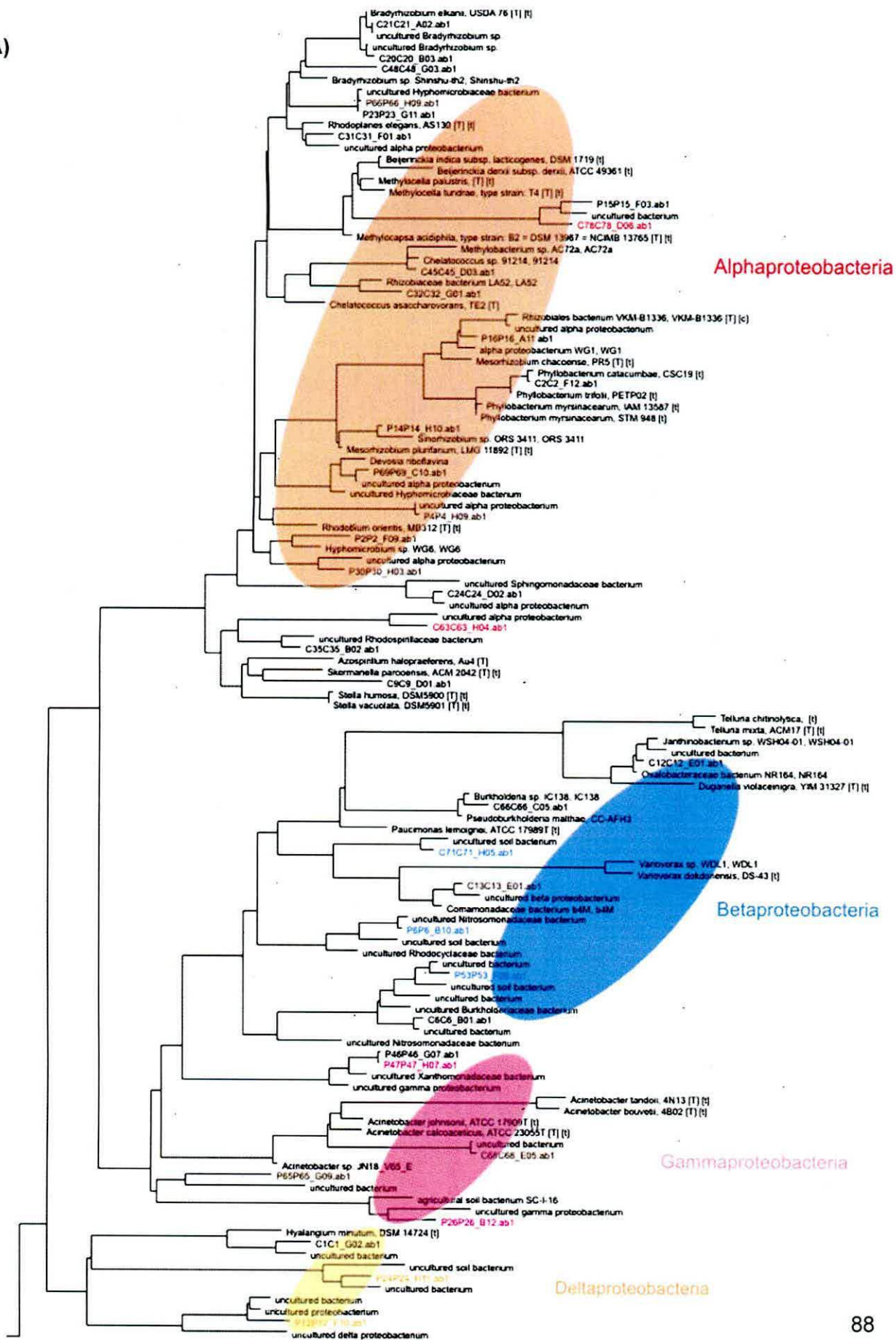


Figura 34. Estimación de la actividad de microorganismos degradadores de simazina (ACDS) en microcosmos de suelo tipo B y en presencia de plantas. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

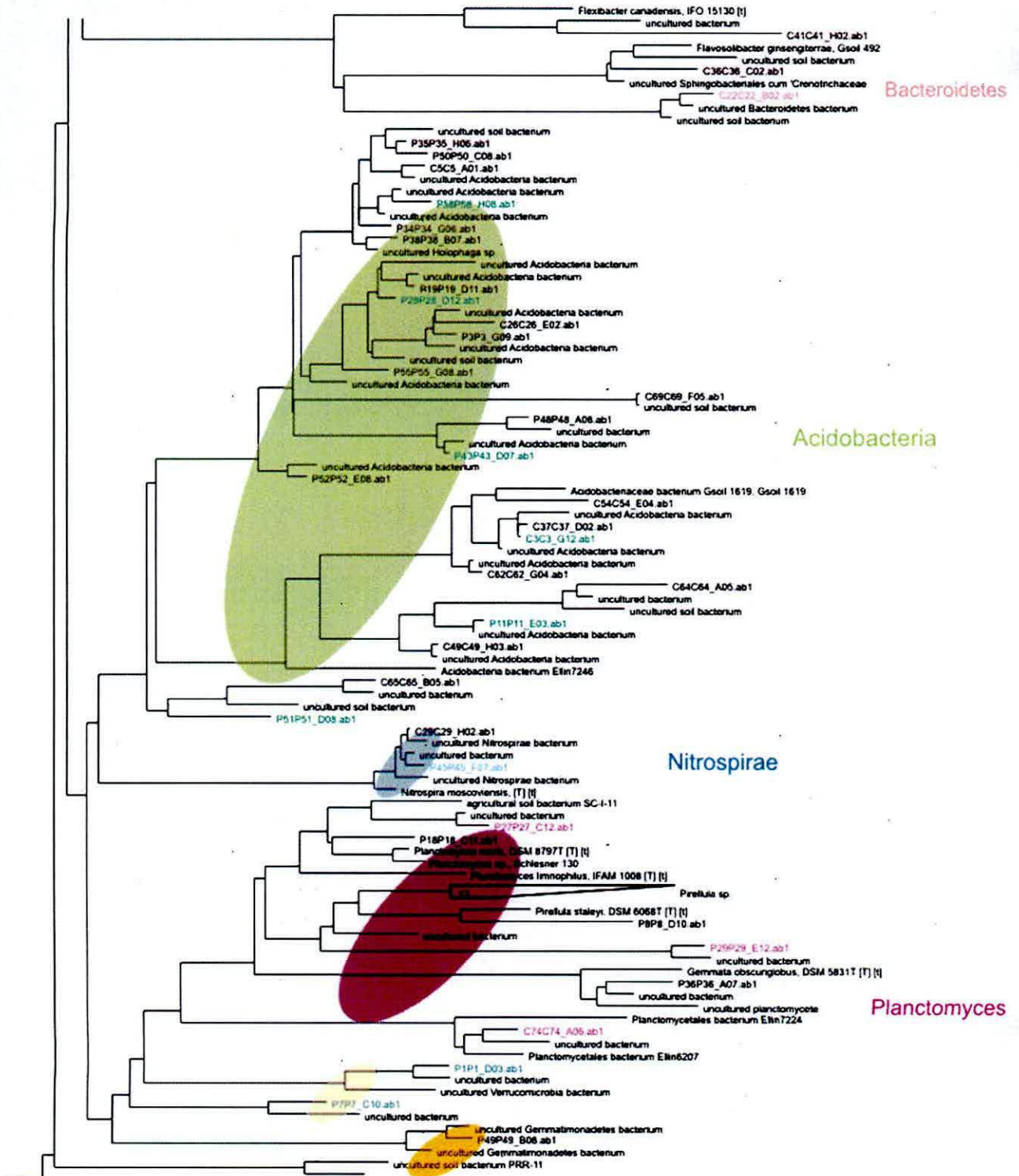
7. Diversidad y estructura de las comunidades microbianas de suelo

La caracterización de la estructura y diversidad de ecosistemas agrícolas de la Región de Valparaíso (suelos A y B) se realizó mediante la creación de dos genotecas del gen 16S rRNA. Se obtuvieron en total 104 clones, 54 clones con secuencias parciales en la librería del suelo A y 50 clones con secuencias parciales en la librería del suelo B. El árbol filogenético que se muestra en la Figura 35, fue construido con una región de solapamiento de 500 a 800 pb para todas las secuencias parciales del gen 16S rRNA obtenidas en este estudio. El análisis de las secuencias de los clones de ambas librerías indicó la presencia, principalmente, de bacterias aerobias. La comparación de estas secuencias con aquellas descritas en las bases de datos mostró una similitud que osciló en un rango de 80% al 99%. En general, una similitud de secuencia entre el 80% al 90% fue asignada entre los clones obtenidos en esta tesis y las secuencias de especies tipo. En cambio, similitudes superiores (90% a 99%) fueron asociadas a clones no cultivados provenientes de muestras ambientales (base de datos ARB, SILVA-SSU).

A)



B)



C)

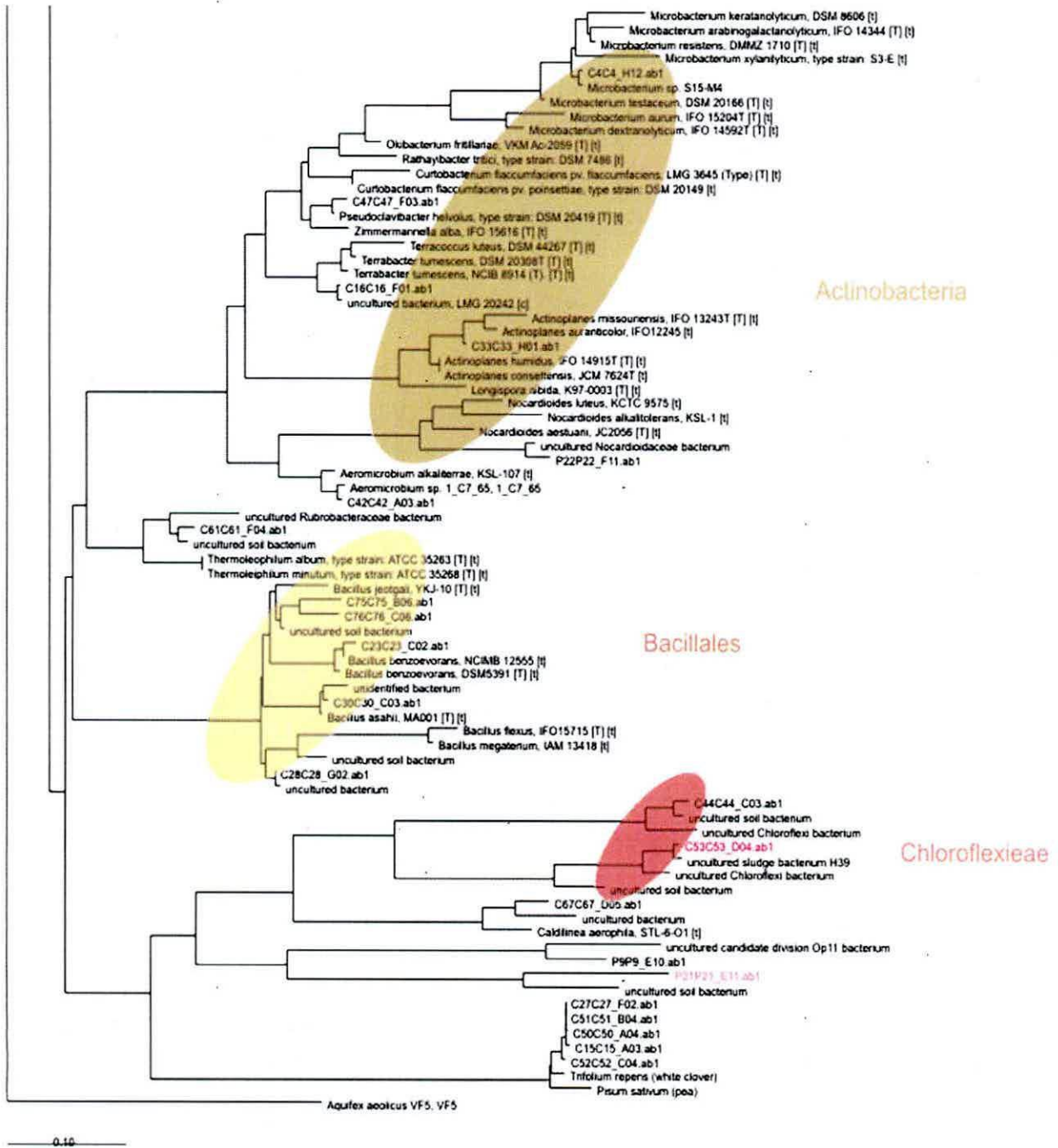


Figura 35. Árbol filogenético construido a partir de secuencias parciales del gen 16S rRNA de los clones obtenidos y aquellos contenidos en la base de datos SILVA-SSU. (A) α - β - γ - δ -Proteobacteria, (B) Bacteroidetes, Acidobacteria, Nitrospirae, Planctomyces y Gemmatimonadetes (C) Actinobacteria, Bacillales y Chloroflexiae. (Los clones pertenecientes a la librería de suelo A se designan con una C mientras que los pertenecientes a la librería de suelo B se designan con una P).

La Figura 36 muestra la diversidad bacteriana de los suelos agrícolas de la Región de Valparaíso. En general, la clase de las *Proteobacteria* fue el grupo filogenético predominante en ambas librerías (34% de las secuencias). Un 27% de las secuencias, pertenecieron al filum *Acidobacteria*. Estos grupos son seguidos en menor proporción por *Actinobacteria* (7%), *Planctomycetes* (6%), *Firmicutes* (5%) y *Bacteroidetes* (4%). Los grupos minoritarios lo representan: *Chloroflexi*, *Nitrospirae*, *Verrucomicrobia* y *Gemmatimonadetes* (Fig. 36A). Se realizó un análisis de rarefacción con el fin de determinar la cobertura de diversidad bacteriana (Fig. 36B). El análisis de rarefacción indica una diversidad muy alta en los suelos estudiados, asumiendo que un OTU está formado por las secuencias que presentan una similitud $\geq 97\%$ (Zaballos *et al.*, 2006; Rosselló-Mora and López-López, 2008). Los resultados de las curvas de rarefacción son indicativos de una elevada diversidad filogenética detectada en ambas librerías, e indican que el tamaño de las librerías fue insuficiente para estudiar la diversidad total de las muestras, como ocurre en la mayoría de los ecosistemas de los suelos. Para esta comunidad de suelos agrícolas, se calcularon los siguientes índices: índice de diversidad de Shannon (H), uniformidad de especies (E) y dominancia (D) mostrando valores de 3,52, 0,87 y 0,055, respectivamente. La E se aproxima al valor máximo posible (1,0) mientras que la D revela un valor bajo, indicando que la mayoría de las secuencias se obtuvieron sólo una vez. Estos resultados son coincidentes con los de la curva de rarefacción. Un número adicional de clones debieran ser secuenciados para alcanzar a cubrir la gran diversidad de los suelos agrícolas.

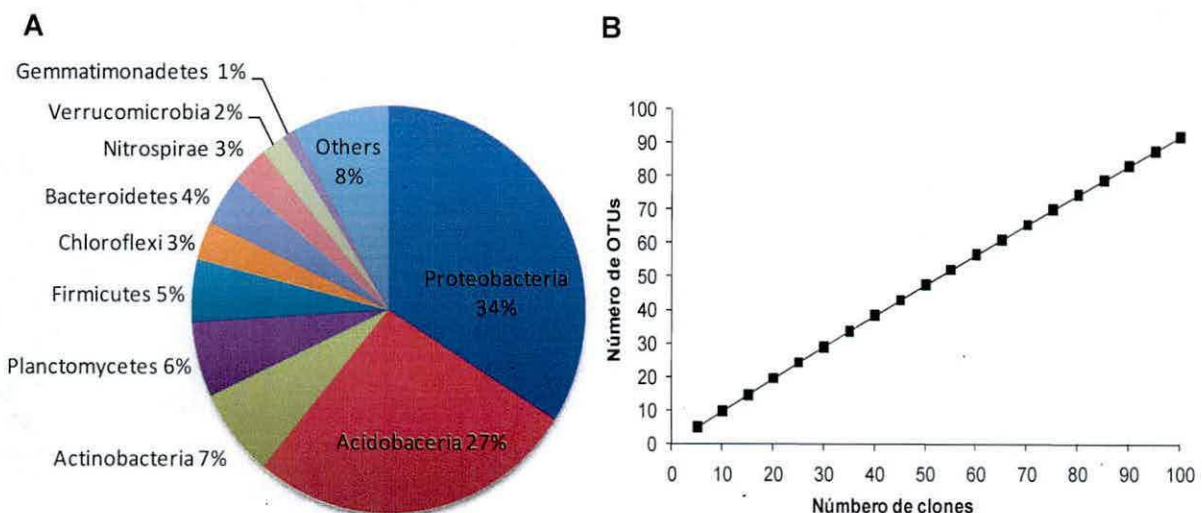


Figura 36. Diversidad bacteriana en suelos agrícolas. A) Distribución de la diversidad bacteriana de suelos agrícolas. B) Curva de rarefacción.

La Figura 37 muestra la diversidad bacteriana de suelos agrícolas según el historial de aplicación del herbicida simazina. Ambas librerías muestran una dominancia de *Proteobacterias*. Respecto a este filum, la clase *Alphaproteobacteria* constituyó el grupo dominante seguido de *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*. Por otra parte, la librería A difiere de la B principalmente en la distribución porcentual de los siguientes grupos filogenéticos: *Acidobacterias* (22% en suelo A vs 30% en suelo B), *Actinobacterias* (11% en suelo A vs 2% en suelo B), *Planctomycetes* (2% en suelo A vs 10% en suelo B) y *Firmicutes* (9% en suelo A vs 0% en suelo B). Asimismo, se evidenciaron algunas diferencias entre ambas librerías en los grupos filogenéticos minoritarios: *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Nitrospirae*, *Verrucomicrobia* y *Gemmatimonadetes*.

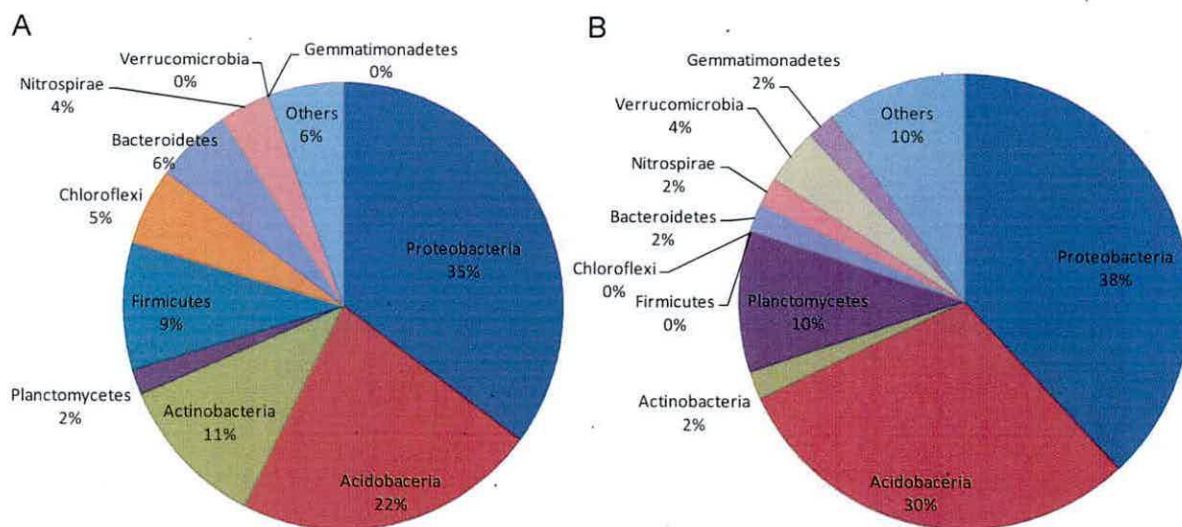


Figura 37. Distribución de la diversidad bacteriana en suelos agrícolas según el historial de aplicación de herbicida simazina. A) Librería génica de suelo sin historial de aplicación de simazina, suelo tipo A. B) Librería génica de suelos con historial de aplicación de simazina, suelo tipo B.

Finalmente, se completaron las secuencias de clones representativos de cada uno de los grupos filogenéticos obtenidos en las librerías génicas de suelos agrícolas. En la Figura 35 se destacan en color los clones seleccionados en cada filum. Como puede observarse en la Tabla 15 se obtuvieron 20 secuencias completas (1.200 a 1.500 pb) del gen 16S rRNA.

Tabla 15. Secuencias completas del gen 16S rRNA de clones representativos de cada uno de los grupos filogenéticos obtenidos en las librerías génicas de suelos agrícolas.

Filiación	Identificación Clones	Tipo suelo ^a	Número de acceso ^b	Longitud secuencia (pb)	Identidad (%)	Similitud	Número base de datos ^c
<i>Acidobacterium</i>	C003	A	FJ468375	1408	94.0	<i>Acidobacteria bacterium</i> Ellin6099	AY234751
	C064		FJ468380	1474	89.2	<i>Acidobacteria bacterium</i> Ellin7246	AM749787
	P011	B	FJ468386	1418	87.5	<i>Acidobacteriaceae bacterium</i> K22	AM749787
	P028		FJ468392	1375	83.2	<i>Holophaga foetida</i> strain TMBS4-T (DSM 6591-T)	X77215
<i>Actinobacterium</i>	P021	B	FJ468388	1389	70.8	<i>Georgenia muralis</i>	EF154258
<i>Alphaproteobacterium</i>	C063	A	FJ468379	1368	90.5	<i>Stella vacuolata</i> , strain DSM5901	AJ535711
	C078		FJ468382	1395	93.0	<i>Mesorhizobium plurifarium</i> strain ORS10056	Y14161
<i>Betaproteobacterium</i>	P006	B	FJ468384	1416	91.9	<i>Burkholderia</i> sp. strain NK8	AB208548
<i>Gammaproteobacterium</i>	P026	B	FJ468390	1423	88.2	<i>Legionella pneumophila</i>	CR628337
	P046		FJ468395	1404	93.3	<i>Xanthomonas campestris</i> strain ATCC 33913	AE012505
<i>Deltaproteobacterium</i>	P007	B	FJ468385	1467	81.2	<i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB	CP000252
	P012		FJ468387	1200	85.6	<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	AE017180
	P024		FJ468389	1446	88.6	<i>Haliangium tepidum</i>	AB062751
<i>Bacteroidetes</i>	C022	A	FJ468377	1351	81.8	<i>Thermonema rossianum</i> strain NR-27T (DSM10300)	Y08956
<i>Chloroflexi</i>	C053	A	FJ468378	1308	82.0	<i>Dehalococcoides</i> sp. strain BHI80-15	AJ431246
<i>Firmicutes</i>	C007	A	FJ468376	1261	81.3	<i>Desulfosporosinus orientis</i>	AJ493052
<i>Nitrospirae</i>	P045	B	FJ468394	1313	95.3	<i>Nitrospira</i> sp.	AJ224039
<i>Planctomycetes</i>	C074	A	FJ468381	1312	94.2	<i>Planctomycetes</i> sp.	AY673410
	P027	B	FJ468391	1225	87.5	<i>Planctomyces maris</i>	X62910
	P029		FJ468393	1395	87.3	<i>Pirellula</i> sp.	X81947
<i>Verrucomicrobia</i>	P001	B	FJ468383	1339	84.6	<i>Prostheco bacter debontii</i> (DSM 14044)	AJ966882

^a Según historial de aplicación de simazina. A: suelo sin historial de aplicación de simazina; B: suelo con historial de aplicación de simazina.

^b Base de datos Genbank

^c Número de acceso según base de datos SILVA-SSU

8. Dinámica de las comunidades microbianas en suelos agrícolas

La dinámica de las comunidades microbianas de suelos agrícolas durante procesos de biorremediación se estudió por microscopía de epifluorescencia mediante técnicas de hibridación *In Situ* (FISH) y mediante el análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP)³.

8.1. Cuantificación de grupos filogenéticos por hibridación *In Situ* (FISH)

Con el fin de comprender los cambios que se producen en la comunidad microbiana de suelos agrícolas debido a la contaminación con simazina y/o a la bioaugmentación, se caracterizó en primer lugar la diversidad por medio de librerías génicas. Dichos estudios previos entregaron el criterio que permitió la selección de los grupos específicos a estudiar por FISH. Se seleccionaron entonces, sondas específicas para la detección de células pertenecientes a los siguientes grupos filogenéticos: *Alfa*-, *Beta*- y *Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, género *Pseudomonas* como así también para el dominio *Bacteria*. Adicionalmente se cuantificó la abundancia relativa de microorganismos pertenecientes al dominio *Achaea* (Tablas 9 y 10).

³ Estos resultados contribuyeron a la siguiente publicación científica: Hernández, M., V. Morgante, C. Flores, P. Villalobos, M. González, P. Miralles, M. A. Dinamarca and M. Seeger. 2008. Modern approaches for the study of bioremediation of s-triazine herbicides in agricultural soils. *J. Soil Sci. Plant Nut.* 8 (2): 19-30.

La técnica de FISH se ha utilizado con éxito para analizar comunidades microbianas en diferentes ambientes. Metodológicamente la técnica implica una fijación de las muestras que incrementa la permeabilidad y mantiene la integridad morfológica de las células. Luego, las mismas se hibridan con las sondas específicas de rRNA marcadas con un fluorocromo en el extremo 5'. Posteriormente, se visualizan en un microscopio de epifluorescencia pudiéndose comparar cuantitativamente la población total analizada con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) con la población específica que hibrida con la sonda utilizada.

La Tabla 16 muestra que la abundancia microbiana en ambos suelos agrícolas fue alta ($\sim 2,0 \times 10^{10}$ cel g^{-1}). No se observaron diferencias significativas en la abundancia entre el suelo A y B luego de 28 d de incubación ($1,91 \times 10^{10}$ y $2,11 \times 10^{10}$ cel g^{-1} , respectivamente). Tampoco se observaron diferencias en el número total de microorganismos por efecto de la bioaumentación ($2,05 \times 10^{10}$ cel g^{-1} en el suelo A y $2,96 \times 10^{10}$ cel g^{-1} en el suelo B, respectivamente).

Tabla 16. Estimación de la abundancia de microorganismos en suelos agrícolas durante ensayos de biorremediación con la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41.

	Días	Suelo A		Suelo B	
		Control	Inoculado	Control	Inoculado
Abundancia (DAPI)	0	$(1,53 \pm 0,31) \times 10^{10}$		$(2,11 \pm 0,21) \times 10^{10}$	
	28	$(1,91 \pm 0,24) \times 10^{10}$	$(2,05 \pm 0,26) \times 10^{10}$	$(2,11 \pm 0,16) \times 10^{10}$	$(2,96 \pm 0,18) \times 10^{10}$

La Figura 38 muestra la dinámica de grupos filogenéticos específicos durante el experimento de bioaumentación en ambos suelos agrícolas.

En los suelos agrícolas con y sin historial de aplicación de simazina aproximadamente el 50% de la microbiota detectable por DAPI fue identificada como miembro del dominio *Bacteria* (EUBI, EUBII y EUBIII) al inicio del experimento (0 d). Después de 28 d, no se detectaron cambios asociados a la aplicación de simazina en el número de células EUB-positivas pero sí en función de la inoculación con la cepa MHP41, siendo este aumento mayor en el suelo B. Además, en ambos suelos fue posible detectar

arqueas en valores aproximados al ~5% del total de células DAPI (7×10^8 cel g^{-1} en el suelo A y 6×10^8 cel g^{-1} en el suelo B, Fig 38). Dicho grupo filogenético no se vio modificado por efecto de la aplicación del herbicida o por la bioaumentación con la cepa MHP41.

A tiempo 0 d, se detectó un alto número de células que hibridaron con las sondas específicas Alf1b (*Alphaproteobacteria*), HoAc1402 (*Acidobacteria*), y Pla886 (*Planctomycetes*) en ambos suelos A y B. *Alphaproteobacteria* es el grupo dominante (10-20%) seguido por *Planctomycetes* (~11%), *Acidobacteria* (~9%), *Betaproteobacteria* (~9%) y *Gammaproteobacteria* (~2%) y *Pseudomonas* (<1%), (Fig. 38).

Independientemente del historial de aplicación de simazina de los suelos, la bioaumentación promovió cambios en la abundancia relativa de algunos grupos bacterianos estudiados. Al cabo de 28 d del ensayo *Alphaproteobacteria*, *Planctomycetes* y *Acidobacteria* mostraron un incremento de aproximadamente 3 veces su abundancia relativa en tratamientos inoculados con la cepa MHP41 en ambos suelos. En general, no se observaron diferencias en la abundancia relativa del resto de los grupos bacterianos cuantificados: *Betaproteobacteria* (sondas BET42a), *Gammaproteobacteria* (sonda GAM42a) y *Pseudomonas* (PS56a), a lo largo del experimento. Por efecto de la aplicación de simazina, solo se observaron cambios en la abundancia relativa de *Alphaproteobacteria*, principalmente en suelos sin historial de aplicación de simazina y de *Alphaproteobacteria* y *Planctomycetes* en suelos con historial de aplicación de simazina.

En ambos suelos agrícolas, la población bacteriana del género *Pseudomonas* (sonda PS56a) fue detectada sólo en números que se mantuvieron por debajo del límite de detección (fijado en el 1% de la abundancia obtenida por DAPI). En este género, no se observaron variaciones en su abundancia relativa por efecto de la bioaumentación.

Por último, no se asocian cambios en los grupos filogenéticos estudiados por efecto de la aplicación de simazina.

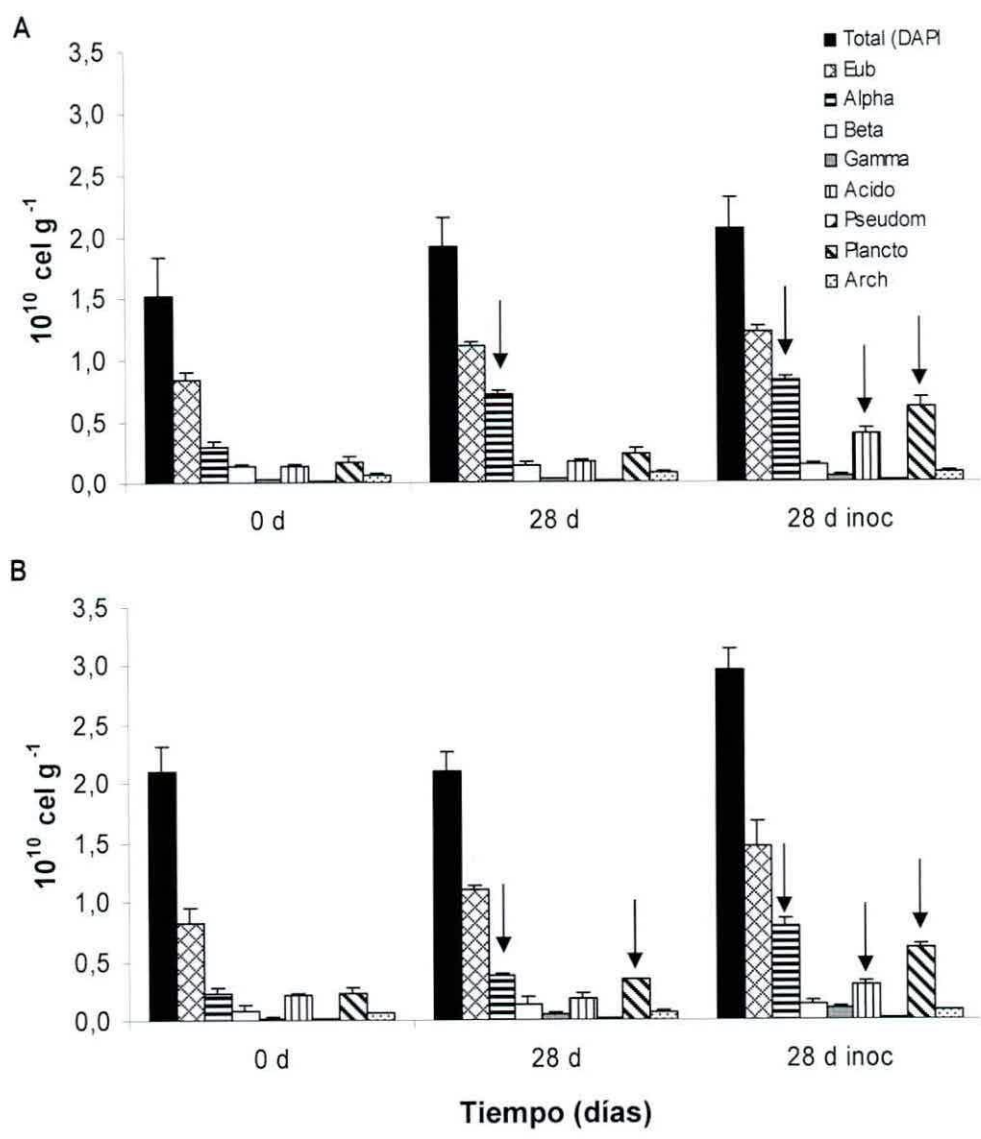


Figura 38. Dinámica de las comunidades microbianas detectadas por FISH durante el ensayo de bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41. A) Suelo sin historial de aplicación de simazina (suelo A). B) Suelo con historial de aplicación de simazina (suelo B). Los resultados representan el promedio de tres recuentos independientes. Las barras verticales representan la desviación estándar. (Inoc: Tratamientos bioaumentados).

8.2. Análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP)

Es una técnica molecular desarrollada para el análisis rápido y sensible de la dinámica de las comunidades microbianas. Se utilizan los productos de PCR de genes de 16S rRNA, marcados con un compuesto fluorescente (en uno de los 2 primers). Posteriormente, dicho producto de PCR marcado es digerido mediante enzimas de restricción generándose una serie de fragmentos. Uno de los dos fragmentos terminales está marcado con un fluorocromo y el mismo es detectado y cuantificado en un secuenciador automático de DNA. La Figura 39 ilustra la extracción de DNA comunitario realizado por triplicado para todas las muestras de suelo y la respectiva amplificación por PCR de los genes 16S rRNA. Se realizaron análisis de restricción de los productos de PCR con las endonucleasas *HhaI* y *MspI*.

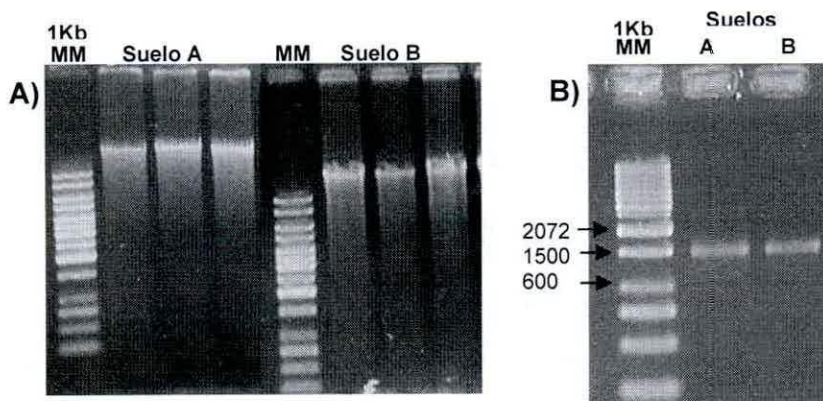


Figura 39. Extracción de DNA desde muestras de suelo y amplificación del gen 16S rRNA. A) DNA comunitario de muestras de ambos tipos de suelo agrícola separados por electroforesis en gels de agarosa 1%. B) Productos de PCR de la amplificación de genes 16S rRNA analizados por electroforesis en gel de agarosa 1% p/v.

8.2.1. Análisis de T-RFLP con la enzima de restricción *HhaI*

A continuación y de modo representativo se muestran los perfiles de restricción realizado con la enzima *HhaI* en ambos suelos durante la bioaumentación con la cepa MHP41.

Se calcularon las abundancias relativas de los fragmentos terminales de restricción (TRFs) obtenidos en el electroferograma para cada muestra. Las Figuras 40 y 41 muestran el perfil de restricción obtenido con la enzima *HhaI* para ambos tipos de suelos a diferentes tiempos (0, 16 y 28 d) durante el experimento de bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41.

Se pueden apreciar, por análisis visual, algunas variaciones en los perfiles de restricción según dos factores de análisis "bioaumentación" o "incubación con simazina" para las muestras de suelos estudiados. En suelos sin historial de aplicación de simazina (suelo A), las variaciones asociadas a la bioaumentación se aprecian para los TRFs de 86, y 363 pb de longitud. Las variaciones en la abundancia relativa de los TRFs de 39, 203 y 235 pb de longitud se asocian a la incubación con simazina. Para suelos con historial de aplicación de simazina (suelo B) la incubación con el herbicida promovió cambios en la abundancia relativa de TRFs de longitud 35, 150 y 486 pb. La bioaumentación con la cepa MHP41 incrementa notablemente el TRF de 85 pb en este suelo.

Para una interpretación más exhaustiva de las variaciones observadas en los perfiles generados por T-RFLP, se recurrió a un análisis estadístico multivariado. El efecto de los factores experimentales "bioaumentación" e "incubación con simazina" analizado por el método NMDS se observa en la Figura 42. El análisis mostró que los datos de TRFs del suelo sin historial de aplicación de simazina (suelo A) se ordenan separadamente por inoculación y aplicación de simazina (Fig 42A). Por el contrario, en suelo con historial de aplicación de simazina (suelo B), el efecto por bioaumentación es menos evidente, donde los TRFs se agrupan en función de la incubación con simazina (Fig. 42B).

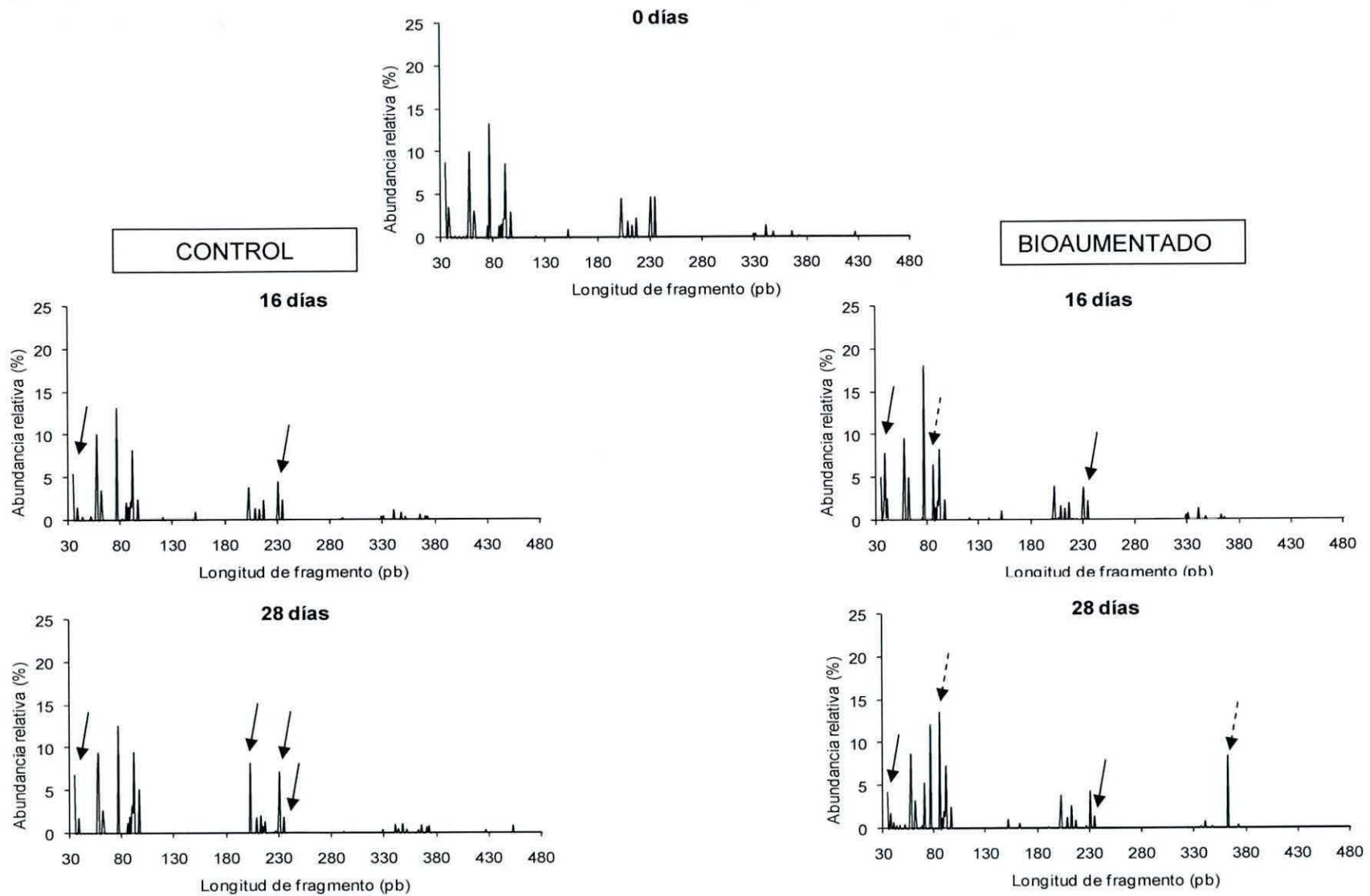


Figura 40. Perfiles de restricción con la enzima *HhaI* de muestras de suelo sin historial de aplicación de simazina (suelo A) durante ensayos de bioaumentación con la cepa MHP41. Las flechas indican algunas variaciones observadas visualmente por efecto de la incubación con simazina (línea sólida) o bioaumentación (líneas punteadas).

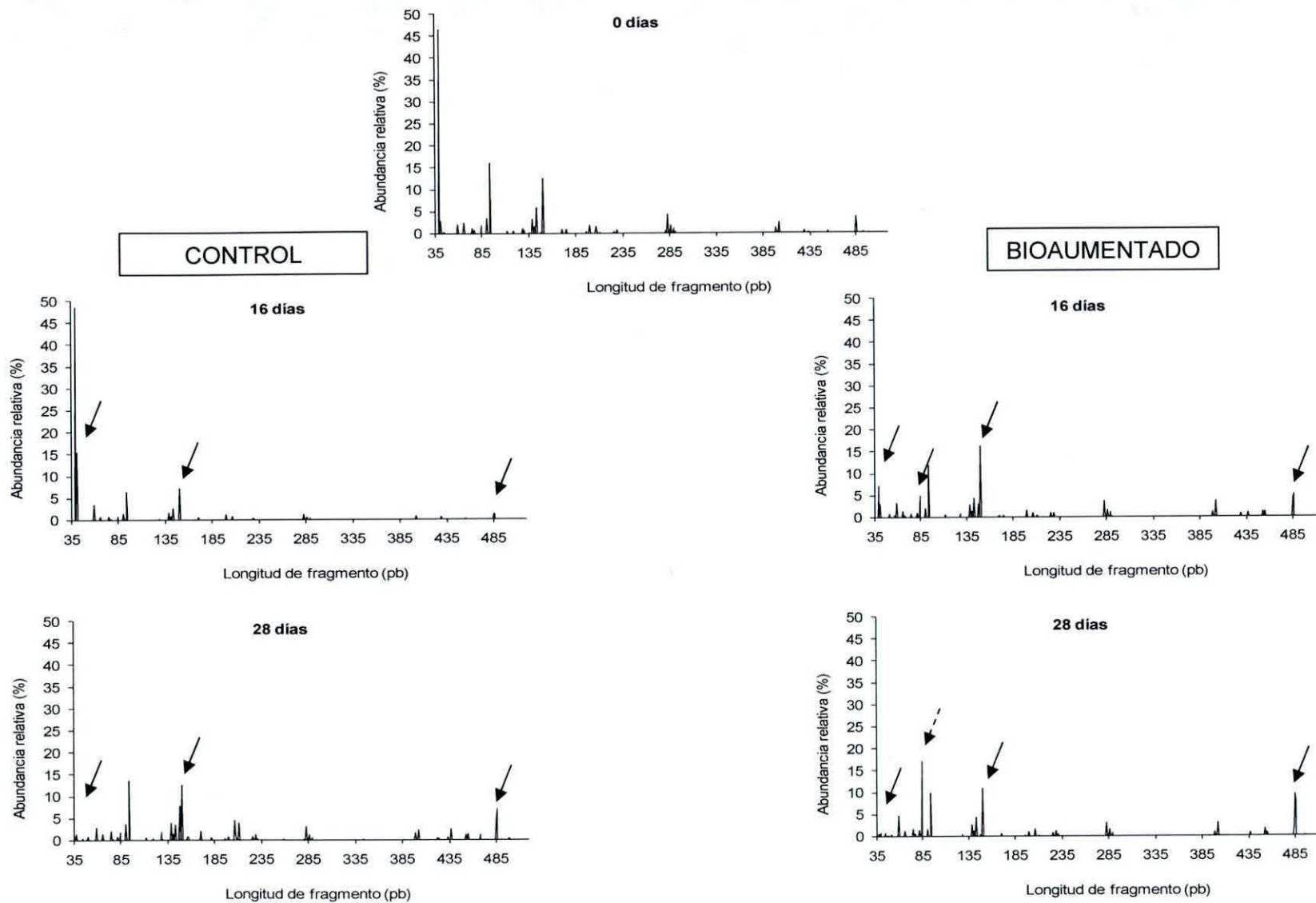


Figura 41. Perfiles de restricción con la enzima *HhaI* de muestras de suelo con historial de aplicación de simazina (suelo B) durante ensayos de bioaumentación con la cepa MHP41. Las flechas indican algunas variaciones observadas visualmente por efecto de la incubación con simazina (línea sólida) o bioaumentación (líneas punteadas).

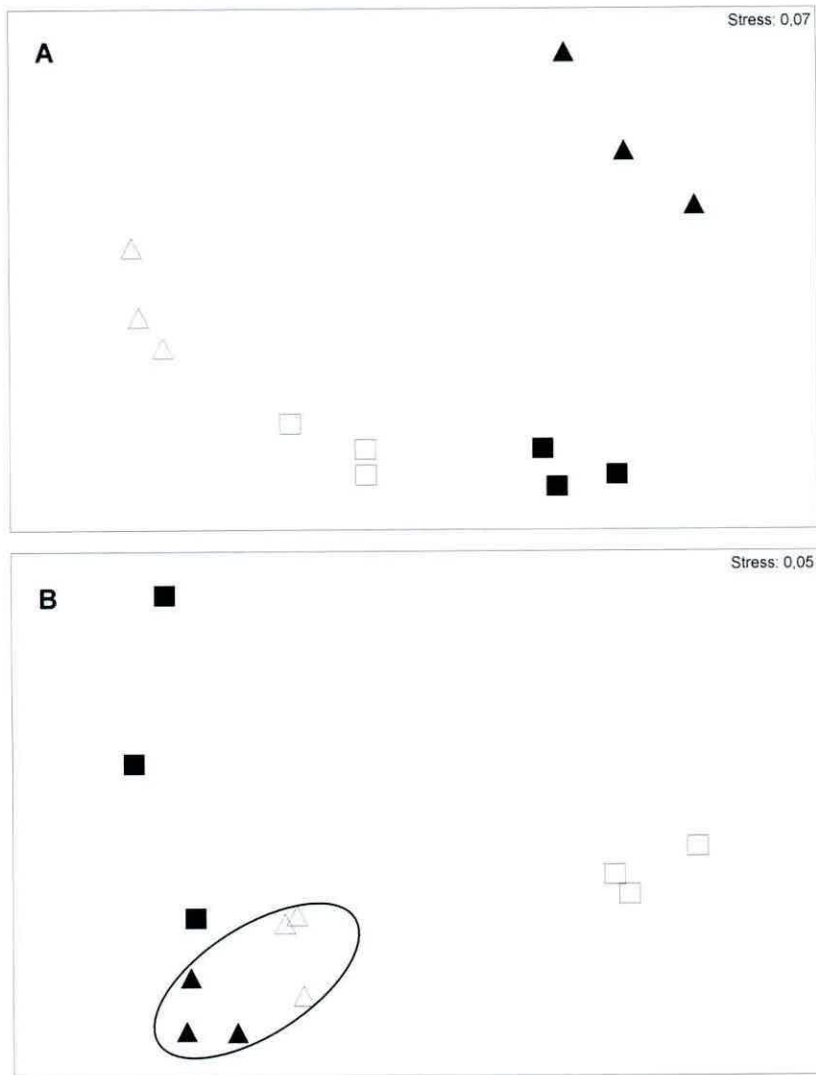


Figura 42. Análisis multivariado (NMDS) de los TRFs obtenidos a partir de la restricción del gen 16S rRNA con endonucleasa *HhaI* de muestras de suelo agrícola durante ensayos de bioaumentación con *Pseudomonas* sp. cepa MHP41. A) Suelo sin historial de aplicación de simazina. B) Suelo con historial de aplicación de simazina. El factor experimental "bioaumentación" se muestra con símbolos abiertos y cerrados. El factor experimental "incubación con simazina" se muestra con símbolo cuadrado a los 16 d y triángulos a 28 d. Claves: Datos 16 d inoculados (□); datos 16 d no-inoculados (■); datos 28 d inoculados (Δ), datos 28 d no-inoculados (▲).

El análisis por ANOSIM de datos experimentales se utilizó para evaluar el efecto de variables “bioaumentación” e “incubación con simazina” sobre la estructura de las comunidades bacterianas de suelo A y B. En el suelo A, la inoculación de la cepa MHP41 afecta la estructura de las comunidades bacterianas, con un valor de R igual a 0,722 ($p < 0,05$). La aplicación de simazina desempeñaría un papel secundario en los cambios observados ($R = 0,348$; $p < 0,05$). En el caso del suelo B, los cambios en las comunidades bacterianas debido a estrategias de bioaumentación son menos marcadas ($R = 0,296$; $p < 0,05$) siendo la aplicación de simazina el factor más importante que afecta a la composición de dichas comunidades ($R = 0,472$; $p < 0,05$). Estos resultados concuerdan con lo observado anteriormente en el análisis multivariado por NMDS.

En consecuencia, las variaciones en la composición de la microbiota bacteriana nativa de suelos agrícolas, debidas a la bioaumentación, se vieron condicionadas al historial de aplicación de simazina. En relación a esta observación, se investigaron los grupos bacterianos cuya abundancia relativa se vio afectada. Los diferentes grupos filogenéticos que fueron asignados sobre la base de TRFs obtenidos de la restricción con las endonucleasas *MspI* y *HhaI* fueron: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Flavobacterias*, *Sphingobacteria* entre otros grupos filogenéticos menos representativos como, *Deltaproteobacteria*; *Chloroflexieae*, y *Spirochaetes* (en concordancia con las librerías de genes descritas).

8.2.2. Análisis de T-RFLP con la enzima de restricción *MspI*

El análisis de la dinámica de las comunidades microbianas también se realizó con la enzima de restricción *MspI*. No obstante, los datos no se muestran ya que presentaron una mayor variabilidad intra-tratamiento y entre grupos control e inoculado a tiempos 0, 16 y 28 d).

9. Estudios de bioaumentación con la cepa bacteriana MHP41 en suelos agrícolas con simazina a escala de campo

Como último objetivo de esta tesis se desarrolló un experimento de bioaumentación con la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 a escala de campo. Para estos estudios se seleccionó como área de estudio un predio aledaño a invernaderos de claveles que nunca había sido tratado con herbicidas s-triazinas. Se aplicó al suelo altas concentraciones de simazina (100 ppm) y se delimitaron 2 sectores designados como S1 (no inoculado con la cepa MHP41) y S2 (inoculado con la cepa MHP41). Un tercer sector (S3) se definió como suelo control sin simazina y sin bioaumentar. La cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 fue adicionada al suelo como inóculo inmovilizado en matriz de alginato en concentraciones de 10^8 cel g^{-1} .

En primer lugar, se determinó el recuento de heterótrofos cultivables. No se observaron diferencias en dicho recuento entre suelos control y bioaumentado en el ensayo a campo (Tabla 17).

Tabla 17. Recuento de heterótrofos cultivables durante experimentos de bioaumentación a escala de campo.

Tipo de tratamiento	Simazine (100 ppm)	Inoculación cepa MHP41	Log UFC g^{-1} suelo seco				
			Días				
			0	3	9	16	23
S1	+	-	6,00±0,10	6,50±0,20	6,10±0,13	6,40±0,02	6,10±0,12
S2	+	+	5,90±0,24	7,00±0,22	5,80±0,21	6,80±0,28	7,10±0,12
S3	-	-	6,00±0,17	5,80±0,13	6,80±0,21	5,90±0,16	5,90±0,15

Durante el experimento, se observó atenuación natural en el suelo control (S1). La bioaumentación permitió reducir el tiempo de vida medio de la simazina desde 13 a 8 d (Fig. 43). Al cabo de 35 d la simazina que permanece en el campo es de 21% en suelos S1 y 10 % en suelos S2. No se detectó simazina en el suelo control, sin historial de aplicación (S3).

La Figura 44 muestra la actividad catabólica de microorganismos degradadores de simazina (ACDS) durante el ensayo. En suelos controles (S1), se detectó una microbiota degradadora de simazina activa desde los primeros días y dicha población cultivable fue un orden de magnitud mayor en comparación con los resultados obtenidos a escala de microcosmos (Fig. 27). No obstante, la bioaumentación con la cepa MHP41 (S2) permitió incrementar la ACDS a valores máximos al cabo de 10 d ($8,0 \times 10^5$ cel g^{-1} ; Fig. 44). En el suelo S3 no se detectó ACDS durante el ensayo. Esto indica que la aplicación de simazina estimuló la microbiota nativa degradadora del herbicida.

La cepa MHP41 inmovilizada es capaz en mantener una actividad degradadora elevada en condiciones de campo no controladas. Sin embargo esta condición no es suficiente para lograr la completa remoción del compuesto. Estos resultados demuestran que en condiciones de campo numerosos factores bióticos y abióticos afectan el proceso de biodegradación.

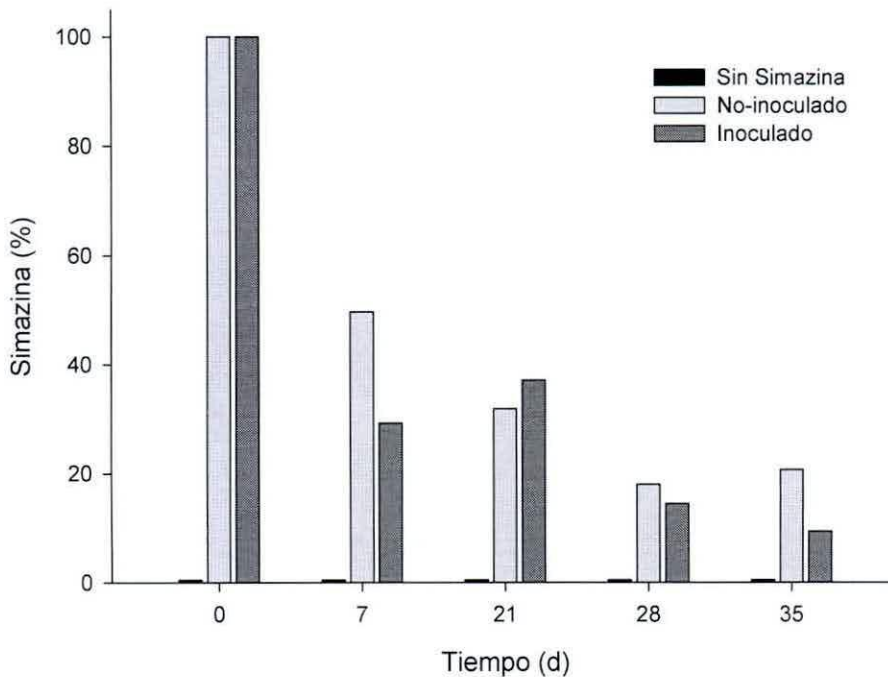


Figura 43. Efecto de la bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 inmovilizada sobre la atenuación de simazina en condiciones de campo. El suelo fue contaminado con 100 ppm de simazina y se cuantificó el herbicida mediante HPLC. Las inoculaciones de la cepa MHP41 (1×10^8 cel g^{-1}) se realizaron cada 7 d. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes.

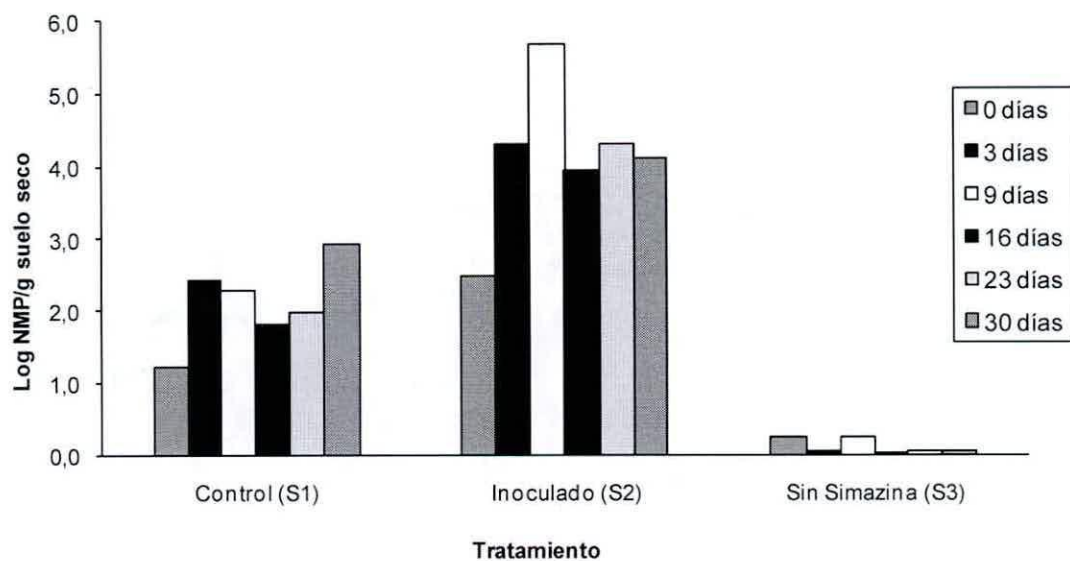


Figura 44. Estimación de la ACDS de simazina durante experimentos de bioaumentación a escala de campo (100 ppm). S1: control; S2: Inoculado y S3: control sin simazina y sin inocular. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes.

DISCUSIÓN

VII. DISCUSION

La biotecnología, entre otras aplicaciones, se emplea con fines de descontaminación y degradación de compuestos xenobióticos presentes en el medio ambiente. La degradación de estos compuestos indeseables la realizan de manera eficiente algunos microorganismos, los que requieren de condiciones adecuadas para poder llevar a cabo su función catabólica.

La degradación microbiana constituye el principal proceso de descontaminación natural. Este proceso se puede acelerar y/o mejorar mediante la aplicación de tecnologías de biorremediación (Alexander, 1999; Wackett y Hershberger, 2001; Philp *et al.*, 2005). El herbicida simazina se caracteriza por ser un contaminante de amplia distribución geográfica, de persistencia moderada a alta y de elevada toxicidad para los sistemas bióticos (Hayes *et al.*, 2006; Gunasekara, 2007), por lo que es un sustrato ideal para evaluar el potencial catabólico de cepas bacterianas de interés en biorremediación.

Las bacterias del género *Pseudomonas* son ubicuas. Se clasifican como bacterias Gram negativas del grupo *Gammaproteobacteria*. Algunos miembros de este género se caracterizan por ser saprófitos del suelo, oportunistas y metabólicamente versátiles ya que poseen la habilidad para metabolizar diversos sustratos (Parales *et al.*, 2002; Wackett, 2003; Palleroni y Moore, 2004; Sørensen y Nybroe, 2004). Por esta razón, las especies del género *Pseudomonas* resultan excelentes candidatas para las aplicaciones biotecnológicas tales como biocatálisis y biorremediación.

La cepa *Pseudomonas* sp. MHP41, que fue empleada en esta tesis como biocatalizador para procesos de bioaumentación, mostró ser eficiente en la degradación del herbicida simazina a escala de laboratorio (Hernández *et al.*, 2008a; 2008c). Este trabajo presentó el desafío de estudiar la capacidad de dicha cepa en procesos de bioaumentación en suelos agrícolas. Los suelos elegidos diferían principalmente en su historial de aplicación de simazina, su textura y contenido de materia orgánica.

Para entender los procesos de biorremediación es relevante determinar los efectos que ejercen diferentes factores abióticos y bióticos sobre la degradación del compuesto. En este contexto, los estudios de bioaumentación se complementaron con estudios físico-

químicos y moleculares del suelo. Las muestras de suelos provenientes de ensayos de bioaumentación fueron analizadas para determinar los cambios en la estructura de las comunidades microbianas durante la biodegradación de simazina mediada por la cepa MHP41.

Biorremediación de simazina en suelos agrícolas mediada por *Pseudomonas* sp. MHP41

Para procesos de biorremediación *in situ* donde la contaminación es tratada en el sitio, las condiciones de operación deben ser optimizadas para lograr una buena tasa de biodegradación y el éxito del tratamiento (Vidali, 2001; Philp *et al.*, 2005). Los parámetros físico-químicos (como pH, temperatura, humedad, textura del suelo, contenido de materia orgánica, entre otros) influyen en el proceso de remoción de contaminantes orgánicos. Estos parámetros afectan la biodisponibilidad del compuesto y condicionan la actividad catabólica de la microbiota nativa (Novak, 1999; Park *et al.*, 2003; Regitano *et al.*, 2006; Gunasekara *et al.*, 2007). Se determinó que en los suelos agrícolas estudiados, la adsorción de simazina es un proceso reversible, moderado, de carácter físico y gobernado por enlaces tipo puentes de hidrógeno. En el suelo sin historial de aplicación de simazina (suelo A, franco-arcilloso) la adsorción de simazina se debe principalmente a interacciones con la fracción arcillosa, mientras que en el suelo con historial de aplicación de simazina (suelo B, franco) a interacciones con la materia orgánica. En consecuencia, en los suelos agrícolas de la Región de Valparaíso el herbicida simazina está disponible para la degradación biológica (Flores *et al.*, 2008).

Una de las limitaciones que presenta la bioaumentación está relacionada con la dificultad que presentan las cepas inoculadas para colonizar el ambiente contaminado y mantener su actividad catabólica (Gentry *et al.*, 2001; Vogel and Walter, 2002). Fundamentalmente, varios factores bióticos y abióticos afectan la supervivencia y la actividad catabólica de la cepa introducida al suelo. Entre los factores abióticos se destacan, la disponibilidad de agua y nutrientes, contenido de metales, pH y temperatura. Entre aquellos factores bióticos, las interacciones que se establecen entre los microorganismos como la competencia o sinergismo y la predación son relevantes (Manzano *et al.*, 2007). Por ejemplo, los protozoos, fracción activa de la microbiota eucariota de los suelos, son responsables de

la predación bacteriana, fenómeno que fue descrito por Manzano et al. (2007). En estas situaciones, la necesidad de protección del inóculo es relevante.

La encapsulación de células de la cepa MHP41 en una matriz de alginato es una de las estrategias de bioaumentación estudiadas en esta tesis. El proceso de encapsulación se realizó para proteger a la bacteria degradadora de simazina y, por lo tanto, promover una mayor degradación de la simazina en el suelo. Mediante experimentos en medios acuosos se comprobó que el confinamiento de las células en matriz de alginato no afectó la viabilidad ni la capacidad de degradación de simazina de *Pseudomonas* sp. MHP41. Por otra parte, las cápsulas de alginato son un reservorio de células activas que son liberadas lenta y constantemente al medio ambiente contaminado (Mertens *et al.*, 2006; Jezequel y Lebeau, 2008). Estos resultados junto con otros antecedentes reportados (Cassidy *et al.*, 1996; Gentry *et al.*, 2004; Vancov *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008), impulsaron la aplicación de este procedimiento para estrategias de biorremediación *in situ* de simazina en suelos.

Se han realizado numerosos estudios para determinar la degradación de atrazina en suelo, mediante la bioaumentación con microorganismos aislados desde suelos (Struthers *et al.*, 1998; Newcombe and Crowley, 1999; Kristensen *et al.*, 2001). Los resultados indican que se pueden alcanzar altas tasas de degradación para este compuesto. No obstante, una variedad de estrategias para la optimización de la bioaumentación han sido propuestas. Es por ello que en esta tesis, se consideraron dichas estrategias con el fin de superar el posible fracaso de la bioaumentación:

a) Inoculación con una cepa nativa, aislada desde los mismos ecosistemas que se pretende descontaminar (Rousseaux *et al.*, 2003).

b) Aplicación de alta densidad del inóculo ($\sim 10^8$ células g^{-1} de suelo). En general, la biorremediación de otros plaguicidas clorados se ha logrado por bioaumentación con tamaños de inóculo altos (Silva *et al.*, 2004; Mertens *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2007). La bioaumentación con la cepa *Pseudomonas* sp. ADP, que se ha convertido en la bacteria de referencia en términos de degradación de s-triazinas en el suelo, fracasó cuando se inoculó en dosis de a 10^5 células g^{-1} , pero fue exitosa cuando fue empleada en inóculos de 10^7 células g^{-1} (Topp, 2001).

c) Inoculación repetitiva de la bacteria en el ambiente contaminado garantiza la elevada actividad de las células adicionadas a lo largo del tiempo, independientemente de la

supervivencia del inóculo (Dejonghe *et al.*, 2001). Newcombe y Crowley (1999) demostró que realizar sucesivas inoculaciones incrementa de forma importante la tasa de degradación de atrazina. Al cabo de 40 días, los resultados muestran 90% de mineralización de atrazina en los microcosmos con repetidas inoculaciones y un 38% de mineralización en los microcosmos donde sólo se inoculó una vez.

La bioaumentación en el suelo sin historial de aplicación de simazina reveló que la cepa MHP41 es eficiente en la remoción de simazina, inclusive a altas concentraciones. La bioaumentación produjo un significativo aumento en el tiempo de la ACDS en los microcosmos inoculados. Como se postuló en reportes anteriores, el confinamiento en matriz de alginato confiere protección a la célula y al ser un material semipermeable permite la difusión de nutrientes y productos intracelulares (Vogel *et al.*, 2002, Vancov *et al.*, 2005). Además, en esta tesis se demostró la ocurrencia de la atenuación natural y la presencia de microorganismos indígenas (microbiota nativa) degradadores de simazina en suelos que no habían sido tratados con herbicidas s-triazina (suelos tipo A). Estas observaciones se fundamentan en la presencia de comunidades microbianas autóctonas latentes que se activan por la aplicación de simazina (Rhine *et al.*, 2003) y permiten especular sobre la transferencia horizontal de genes involucrados en la degradación del herbicida, fenómeno que fue descrito por varios autores (de Souza *et al.*, 1998; Top and Springael, 2003; Springael and Top, 2004; Aislabie *et al.*, 2005).

Resultados diferentes se observaron en suelo con historial de aplicación de simazina (suelos B), donde se detectó una alta actividad nativa de degradadores de simazina desde fases tempranas del experimento. La remoción de simazina en este suelo fue similar en los microcosmos inoculados y en los controles al cabo de 28 días. No obstante, la bioaumentación con la cepa MHP41 aceleró la tasa de remoción (el tiempo de vida medio de la simazina disminuye desde 10 hasta 3 días) e incrementó la ACDS. Resultados semejantes, donde el historial de aplicación de atrazina determina la presencia de una microbiota nativa capaz de degradar el compuesto, fueron informados por Hang *et al.*, (2003) Morán *et al.*, (2006) y Krutz *et al.*, (2008). Numerosos investigadores han señalado la idea de resiliencia de poblaciones microbianas del suelo degradadoras de compuestos xenobióticos asociadas al historial de aplicación del contaminante (Shapir *et al.*, 2000; Girvan *et al.*, 2005). Respecto a los herbicidas s-triazinas, la tasa de biodegradación en suelos agrícolas dependen de la historia de tratamiento, la cual confiere al suelo la capacidad de

auto-remediación (Ralebitso *et al.*, 2002; Morán *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos de los estudios de biorremediación con suelos agrícolas tipo A concuerdan con lo expuesto anteriormente. La biorremediación observada es función de la adaptación metabólica y genética de las poblaciones microbianas a su medio ambiente (Devinny y Chang, 2000). Mediante la perturbación de la microbiota nativa, se comprobó el papel central que desempeñan los microorganismos nativos en este tipo de suelo y su adaptación al compuesto como consecuencia de la rutinaria aplicación del herbicida desde hace más de 20 años. En estos suelos, la atenuación natural es un proceso importante para la remoción de simazina en comparación con la presencia de plantas y condiciona la aplicabilidad de otras técnicas de biorremediación, como la bioaumentación.

La atenuación natural, aunque muchas veces no es considerada como una técnica de descontaminación propiamente tal, está englobada dentro de las técnicas de remediación *in situ* de muy bajo costo. Su característica principal es la utilización de los procesos físico-químicos de interacción contaminante-suelo y los procesos de biodegradación que tienen lugar de forma natural en el medio. Estos procesos pueden contribuir exitosamente en la disminución de la concentración de los contaminantes. Entre los factores que influyen en la eficacia de la atenuación natural destacan: la existencia de condiciones ambientales y geológicas favorables; la necesidad de reducción del contaminante en un intervalo razonable de tiempo dependiendo del tipo de compuesto, su toxicidad y persistencia en el ambiente; la confirmación de la existencia de microorganismos capaces de la biodegradación de los contaminantes; la producción en el medio de subproductos de carácter más persistente o tóxicos que los iniciales.

En las situaciones en que uno o más de estos factores mencionados fracasan, el uso técnicas alternativas de biorremediación, como la bioaumentación, puede resultar beneficioso (Vogel, 1996; Alexander, 1999). Se han descrito numerosas situaciones en las que la bioaumentación ha funcionado exitosamente (Tabla 5). Sin embargo, en cada caso particular se debe estudiar la necesidad o no de aplicar inóculos exógenos, así como sus condiciones óptimas de aplicación (Vogel, 1996). En el año 2001, Topp describió el incremento en la degradación de atrazina por la inoculación con *Pseudaminobacter* sp. y *Nocardioides* sp., demostrando la remoción del herbicida en 30 d. En otro estudio de bioaumentación, se mostró la degradación del 72% de atrazina cuando la cepa *Pseudomonas* sp. ADP fue reiteradamente inoculada durante 11 semanas en suelos

contaminados (Newcombe y Crowley, 1999). Por otra parte, algunos autores han considerado al proceso de bioaumentación como un método de donación de genes catabólicos, proceso que han denominado como bioaumentación de genes o “gene bioaugmentation” (Pepper *et al.*, 2002; Springael, 2003). En el caso de la bioaumentación de s-triazinas, la inoculación de las bacterias degradadoras aportaría a la totalidad de la comunidad microbiana del suelo los genes catabólicos *atz* involucrados en la ruta de degradación de los herbicidas.

Con el fin de confirmar la eficiencia del proceso de biorremediación bajo condiciones ambientales naturales, se llevó a cabo un experimento a escala de campo. Durante este experimento, factores abióticos tales como: la temperatura, disponibilidad de agua y el pH fueron dinámicos. En general, la temperatura atmosférica en el sector experimental fluctuó de 13 a 28 ° C y la humedad osciló entre el 12 y el 15% mientras que el pH del suelo fue de aproximadamente neutro (7,2) durante todo el ensayo. Estas fluctuaciones bajo condiciones experimentales de campo, sumadas a las fenómenos de escorrentía provocados por lluvias ocasionales pudieron haber acelerado el procesos de remoción simazina en el tratamiento control. La atenuación natural observada se puede atribuir no sólo a factores abióticos, sino también a la actividad microbiana (ACDS) de las comunidades indígenas, detectada durante fases tempranas del experimento. La bioaumentación con la cepa MHP41 encapsuladas no acelera la remoción de simazina respecto al control, pero eleva los niveles de ACDS desde el inicio y a lo largo de todo el experimento de campo (35 días). Esto se podría explicar porque la inmovilización de células en materiales como el alginato, confieren protección al inóculo preservando su capacidad catabólica en ambientes poco favorables (Mertens *et al.*, 2006; Vancov *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008). Algunos ejemplos de bioaumentación a escala de campo de compuestos organo-clorados (lindano, pentaclorofenol, etc.) fueron descritos obteniéndose resultados variables (Lamar *et al.*, 1994; Mertens *et al.*, 2006). Strong *et al.* (2000) fueron capaces de demostrar la disminución de los niveles de atrazina durante experimentos de campo mediante la inoculación de la cepa *E. coli* que sobreexpresaba genes catabólicos *atz*. Labana *et al.* (2005) demostraron que durante estrategias de bioaumentación con la cepa de *A. protophorminae* RKJ100 inmovilizada se completó con éxito la biodegradación de *p*-nitrofenol tanto a escala de laboratorio como en condiciones naturales. Células inmovilizadas de la cepa *Sphingobium indicum* B90A también fueron capaces de incrementar la biodegradación de hexaclorociclohexano (HCH) en estudios de campo (Raina *et al.*, 2008).

Cambios en la estructura de las comunidades microbianas de suelos debidos a la bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41: complementariedad de las técnicas moleculares.

Estudios elaborados por Torsvik *et al.*, (1990 y 2003) sugieren que existen unos 4000 equivalentes genómicos distintos por gramo de suelo, lo que indica que quizás existan 1000 o incluso más especies microbianas diferentes por gramo de suelo. Esta gran diversidad encontrada por Torsvik *et al.*, (1990) también estaría en concordancia con un estudio de Truper (1992). Tan sólo entre un 0,001 y un 1% de los microorganismos viables son actualmente cultivables (Torsvik *et al.*, 2003). En consecuencia, estudios clásicos de diversidad microbiana basados únicamente en el aislamiento de microorganismos dan cuenta de tan sólo una parte minoritaria de la diversidad existente (Amann *et al.*, 1995). Resulta interesante entonces, obtener una visión de la totalidad de la comunidad bacteriana de suelos y, particularmente de aquellos miembros metabólicamente activos, empleando las técnicas moleculares apropiadas. Existen métodos que, mayoritariamente, analizan los ácidos nucleicos existentes en la comunidad, como por ejemplo: PCR y clonaje, PCR acoplada a polimorfismos de la longitud del fragmento terminal de restricción (T-RFLP) o a electroforesis en geles con gradiente desnaturizante químico o térmico (DGGE o TGGE respectivamente) y otros métodos que analizan la composición de la comunidad microbiana por microscopia de epifluorescencia (por ejemplo, técnicas de hibridación *in situ* como FISH). No obstante los beneficios de las técnicas moleculares para el estudio de las comunidades microbianas, cabe mencionar que existen algunas limitantes asociadas al uso de las mismas. Fundamentalmente, dichas limitaciones radican en la extracción de ácidos nucleicos de muestras ambientales, en alteraciones y artefactos asociados a la amplificación enzimática de los ácidos nucleicos, en el clonaje de productos de PCR y en la sensibilidad y accesibilidad de las zonas diana en las técnicas de hibridación celular.

Uno de los objetivos de esta tesis fue el estudio de la diversidad y estructura de las comunidades microbianas de suelos agrícolas contaminados con simazina durante ensayos de bioaumentación con la cepa MHP41. Para ello, fue necesario recurrir a los métodos cultivo-independiente (librerías de genes del gen 16S rRNA, T-RFLP y FISH). El análisis clonal del gen 16S rRNA entrega una amplia información de la composición de la comunidad

ya que permite identificar microorganismos por secuenciación de clones recombinantes. Sin embargo, las principales limitantes son: la extracción diferencial de DNA de microorganismos Gram (-) frente a Gram (+) dada la dificultad de lisar la pared celular de estas últimas, la amplificación preferente de aquellas secuencias más abundantes, la generación de secuencias quiméricas debido a fusiones entre fragmentos con distintas secuencias durante el proceso de amplificación y a que no entrega información referente a la actividad microbiana. En el caso de la técnica T-RFLP, como ventaja se destaca su rapidez y sensibilidad, al poder detectar y cuantificar fragmentos con tan sólo una base de diferencia, y además es repetitiva al utilizar un secuenciador automático de DNA. Como inconvenientes encontramos los que están asociados a las técnicas moleculares (extracción de DNA, limitaciones de la PCR) y además necesita de una librería de clones simultánea para poder asignar los fragmentos terminales a ciertos clones y de esta forma poder secuenciar los clones enteros para tener más fiabilidad en su asignación a un grupo filogenético determinado. La principal particularidad de la técnica FISH, radica en la cuantificación e identificación de grupos microbianos metabólicamente activos en la comunidad. Entre las limitaciones más importantes de esta técnica encontramos la necesidad de optimizar las condiciones de hibridación (variando la temperatura o concentraciones de formamida en la solución de hibridación) para evitar la aparición de falsos positivos. Otras limitaciones importantes son que es muy difícil asegurar que la permeabilidad celular para que la penetración de la sonda sea total y que se necesita normalizar la señal de fluorescencia emitida para cuantificar correctamente los resultados.

Los suelos agrícolas analizados, de la Región de Valparaíso, mostraron una diversidad bacteriana representada por grupos filogenéticos típicos de ecosistemas terrestres. Esto concuerda con otros estudios que han propuesto a los suelos agrícolas como un ambiente reservorio de alta diversidad microbiana (Watanabe *et al.*, 2002; Buckley y Schmidt, 2003; Martin-Laurent *et al.*, 2006). Las librerías construídas para los suelos con y sin historial de aplicación de simazina pusieron de manifiesto que la diferencia más notable entre ambos suelos radica en la predominancia diferencial de *Actinobacteria*, *Planctomycetes* y *Firmicutes* y en la ausencia de algunos clones afiliados a grupos filogenéticos minoritarios como *Bacteroidetes*, *Nitrospirae*, *Verrucomicrobia* y *Gemmatimonadetes*. No obstante, ambos suelos mostraron una dominancia similar de las *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria* principalmente) y *Acidobacteria*. En el año 2006, Janssen y colaboradores examinaron 32

diferentes librerías de clones del gen 16S rDNA y 16S rRNA conteniendo un total de 3.398 clones de bacterias procedentes de diversos suelos en el mundo. Este trabajo reveló que el 92% de los clones recuperados podía clasificarse entre nueve filum distintos: *Proteobacteria* (39,2%), *Acidobacteria* (19,7%), *Actinobacteria* (12,7%), *Verrucomicrobia* (7,0%), *Bacteroidetes* (5,0%), *Chloroflexi* (3,2 %), *Planctomycetes* (2,0%), Gemmatimonadetes (2,0%), y Firmicutes (1,8%). Todos ellos fueron identificados en esta tesis.

El análisis por T-RFLP mostró que la composición de las comunidades microbianas de los suelos estudiados varía en función de la inoculación de la cepa MHP41, principalmente en suelos sin historial de aplicación de simazina. Cambios más sutiles debido a la bioaumentación fueron observados en suelos con historial. Estos resultados son comparables con los hallados por Debarati *et al.*, (2006), quienes analizaron la estructura de la comunidad bacteriana de un suelo con historial de contaminación con pesticidas organofosforados. Los autores demostraron que células inmovilizadas de *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 lograron una mayor degradación del contaminante, pero el análisis por T-RFLP de la estructura de esta comunidad mostró cambios no significativos durante el proceso de biorremediación.

Mediante hibridación in situ (FISH) se observó que la estructura de la comunidad bacteriana de los suelos agrícolas analizados varía en respuesta al proceso de bioaumentación con la cepa MHP41, independientemente del historial de aplicación de simazina y la composición intrínseca de cada suelo. Dichas variaciones se deben a cambios en la abundancia relativa de grupos filogenéticos específicos (*Planctomycetes* y *Acidobacteria*). La cuantificación de la clase *Alphaproteobacteria* mostró que su variación se asocia principalmente a la aplicación de simazina. Especies bacterianas de dichos grupos filogenéticos, probablemente no descritas a la fecha, podrían ser miembros activos en la degradación de simazina jugando un papel central en la funcionalidad de la comunidad bacteriana de suelos agrícolas. Por otra parte, la introducción de 10^8 cel g⁻¹ de la cepa MHP41 en los suelos no incrementó la abundancia relativa del género *Pseudomonas* (células PS56a-positivas). Esto es indicativo de que: *i*) la cepa MHP41 inoculada no estimula cambios en el número de las pseudomonas y, *ii*) el género *Pseudomonas* no sería una fracción importante dentro de las células *Gammaproteobacteria*. Este hecho no es sorprendente ya que estudios previos indicaron que, si bien especies del género *Pseudomonas* son comúnmente cultivadas en el laboratorio desde muestras ambientales

(como la cepa MHP41; Hernández *et al.*, 2008), por lo general, éstas no conformarían una fracción importante dentro de las comunidades microbianas del suelo (Nogales *et al.*, 1999; 2001; Martin-Laurent *et al.*, 2006).

El hecho de que los cambios más evidentes se produjeran después de la bioaumentación, puede indicar que la respuesta se debe principalmente a la actividad directa de la cepa inoculada. En este sentido, la biodisponibilidad de nitrógeno asimilable por parte de los microorganismos puede ser mayor después de la degradación de la simazina, proceso por el cual, se liberan al medio especies ricas en nitrógeno y carbono (Cook and Hütter, 1981; Mandelbaum *et al.*, 1995; Radosevich *et al.*, 1997; Rhine *et al.*, 2003). A la fecha, los resultados de esta tesis demuestran por primera vez los cambios en la estructura de la comunidad microbiana asociados a estrategias de bioaumentación de simazina en suelo mediante la técnica FISH. Caracciolo *et al.*, (2005) examinaron los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana causada por la aplicación de urea y simazina al suelo. En este trabajo, *Alfa-* y *Betaproteobacteria* fueron los grupos más afectados por los tratamientos. No obstante, y a diferencia de nuestro trabajo, no se observaron cambios en el grupo filogenético *Planctomycetes*.

Se debe destacar que los resultados obtenidos a partir de los diferentes métodos de ecología microbiana molecular fueron complementarios y concordantes. Es decir, los mismos grupos filogenéticos que son constitutivos del suelo fueron detectados mediante las librerías y por FISH. Además, la misma dominancia de los grupos fue observada mediante ambas técnicas. Esta complementariedad entre técnicas de ecología molecular también fue descrita por otros autores (Nogales *et al.*, 2001).

Es de esperar, que algunas especies de los grupos filogenéticos hallados sean miembros típicos de las comunidades o consorcios microbianos degradadores de plaguicidas en ambientes contaminados. Por ejemplo, numerosos microorganismos pertenecientes a las *Proteobacteria* y *Actinobacteria* son conocidos por ser importantes degradadores de compuestos tóxicos (Kotouckova *et al.*, 2004; Leys *et al.*, 2004). La clase *Alphaproteobacteria* constituyó el grupo dominante dentro de las *Proteobacteria*, uno de los grupos filogenéticos más afectados en respuesta a la bioaumentación. Además, una elevada homología de las secuencias fue obtenida con especies de *Rhizobium* sp. Estos microorganismos ya han sido descritos por su capacidad en la degradación de atrazina (Bouquard *et al.*, 1997). Miembros del género *Burkholderia*, pertenecientes al grupo de las

Betaproteobacteria, son habitantes comunes de la rizósfera y capaces de degradar diversos pesticidas y contaminantes orgánicos persistentes, tales como fenitotrión (Hayatsu *et al.*, 2000), policlorobifenilos (Seeger *et al.*, 1997; Seeger *et al.*, 2006; Agulló *et al.*, 2007) y otros compuestos aromáticos (Chain *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006). *Gammaproteobacteria* fue otro grupo detectado. Esta tesis y algunos otros estudios han puesto de manifiesto la importancia del género *Pseudomonas* en el catabolismo de s-triazinas (Mandelbaum *et al.* 1995; Hernández *et al.* 2008c). Las *Acidobacteria* constituyen un taxón filogenéticamente diverso y ubicuo, especialmente abundante en hábitats terrestres (Janssen *et al.*, 2002; Macrae *et al.*, 2003). Se sugiere un importante papel ecológico en estos organismos en el suelo (Quasier *et al.*, 2003). Sin embargo, existe escasa información sobre las propiedades metabólicas de este filum y su rol en los ecosistemas.

Una mención especial merece el grupo filogenético *Planctomycetes*. Numerosos clones de la librería del suelo con historial de aplicación de simazina fueron asignados filogenéticamente a este grupo. Además, la abundancia relativa de este grupo aumentó notablemente durante las estrategias de bioaumentación con la cepa MHP41 en ambos tipos de suelos (A y B). Inicialmente, las especies bacterianas pertenecientes a los *Planctomycetes* fueron asociadas a ambientes acuáticos, lo que explica el origen de su nombre. Recientemente, especies de *Planctomycetes* se han encontrado en bibliotecas del gen 16S rRNA generadas a partir de muestras de suelos en los cinco continentes y de una amplia gama de hábitats, incluida suelos agrícolas (Buckley *et al.*, 2006). Los miembros de este grupo son organismos quimioheterótrofos, aerobios o anaerobios facultativos. Algunos de ellos son capaces de reducción anaerobia de nitrato. Buckley *et al.*, (2006) estudiaron la estructura y dinámica de las comunidades de *Planctomycetes* en ecosistemas agrícolas observando variaciones en función de las prácticas agrícolas y la aplicación de compost en el suelo. Aunque no ha sido posible determinar la función de estos microorganismos en los suelos agrícolas estudiados, los resultados hallados ponen de manifiesto que los *Planctomycetes* son miembros metabólicamente activos de la microbiota nativa de suelos agrícolas de la Región de Valparaíso sugieren que el catabolismo de s-triazinas en el suelo podría estar asociado a especies del grupo *Planctomycetes*.

Finalmente, los resultados de biorremediación de simazina, en conjunto con los estudios de adsorción y cambios en la estructura de las comunidades bacterianas nativas de los suelos durante la bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 permitieron una

comprensión más integral del catabolismo del herbicida simazina en suelos agrícolas. Considerando que el empleo de microorganismos es una estrategia ventajosa de biorremediación, *Pseudomonas* sp. MHP41 se posiciona como un buen biocatalizador. No obstante, para estudios de bioaumentación en campo, una tarea relevante es optimizar el proceso para garantizar la mantención de las capacidades de la cepa descrita a escala de laboratorio y microcosmos. Por último, este trabajo puede ser considerado como un modelo de estudio para la comprensión de la degradación de otros compuestos orgánicos en suelo.

CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que:

1. La cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. MHP41, que es autóctona de suelos agrícolas de la Región de Valparaíso, puede ser diferenciada de la cepa modelo degradadora de herbicidas s-triazinas *Pseudomonas* sp. ADP.
2. La cepa MHP41 mantiene su viabilidad y capacidad degradadora de simazina cuando se inmoviliza en matriz de alginato.
3. Los parámetros de interacción K_d y K_f determinados para simazina y los suelos agrícolas estudiados, indican que el compuesto es adsorbido. En el suelo sin historial de aplicación de simazina (suelo A, franco-arcilloso) la adsorción de simazina se debe principalmente a interacciones con la fracción arcillosa, mientras que en el suelo con historial de aplicación de simazina (suelo B, franco) a interacciones con la materia orgánica. Los estudios de entalpía de adsorción indican que el proceso de adsorción de simazina al suelo es de carácter físico y por lo tanto reversible.
4. Los estudios realizados en el marco de esta tesis ponen de manifiesto la eficiencia de los microcosmos para valorar estrategias de biorremediación frente a la contaminación de s-triazinas en diferentes suelos y condiciones. Los resultados generados en microcosmos permiten obtener los conocimientos básicos para el escalamiento de estudios de descontaminación en campo.
5. La aplicación de la técnica de bioaumentación con la cepa MHP41 para la descontaminación de simazina en suelos contaminados con diferentes dosis del herbicida, permiten una remoción significativa en un tiempo corto (1mes). Se alcanzó una alta remoción de simazina en microcosmos de suelos agrícolas sin historial de aplicación de simazina mediante la bioaumentación con la bacteria MHP41 inmovilizada.

6. El historial de aplicación de simazina de un suelo determina la capacidad de autorremediación de dicho ambiente y en consecuencia condiciona la aplicabilidad de otras estrategias de biorremediación. La inoculación de la cepa MHP41 en este tipo de suelos incrementa la actividad catabólica de simazina y reduce la vida media del compuesto, siendo más eficiente que la microbiota nativa. La presencia de plantas no afecta la remoción de simazina en el suelo.
7. En estudios de bioaumentación a campo, la bioaumentación incrementa la actividad catabólica de simazina. No obstante, la atenuación de simazina fue similar entre tratamientos control e inoculados con la cepa MHP41.
8. Los suelos agrícolas del Valle del Aconcagua revelaron una gran diversidad microbiana. La bioaumentación produce cambios similares en la estructura de las comunidades microbianas a nivel de la abundancia relativa de *Acidocaterias* y *Planctomycetes*, independientemente de la composición de las mismas o del historial previo de adaptación al compuesto que los suelos posean. Cambios menores se asocian por efecto de la aplicación de simazina (*Alphaproteobacteria*).
9. Los estudios de biorremediación por bioaumentación con la cepa MHP41 son un modelo para la comprensión de la biodegradación de otros contaminantes orgánicos persistentes en el suelo.

PROYECCIONES

IX. PROYECCIONES

1. Dado que la inmovilización del biocatalizador *Pseudomonas* sp. MHP41 confiere protección y mantiene su actividad degradadora de simazina en el tiempo, resulta de gran relevancia explorar la aplicabilidad de otros soportes o matrices de inmovilización más económicos y acorde con la sustentabilidad del medio ambiente. Una alternativa adecuada es la aplicación del inóculo inmovilizado en subproductos de bajo costo como desechos orgánicos, turba, abono y residuos vegetales.
2. Para estudios de biorremediación en campo con *Pseudomonas* sp. MHP41 los principales desafíos son: *i)* establecer la densidad de inóculo apropiada para bioaumentar, *ii)* encontrar materiales adecuados y económicos para su inmovilización y *iii)* identificar fuentes alternativas de nitrógeno para su crecimiento a gran escala y sin afectar su potencial de degradación del herbicida simazina.
3. La predicción del destino y transporte del contaminante simazina mediante modelos matemáticos son necesarios para comprender su impacto en el ecosistema. Asimismo, estos modelos son una herramienta de apoyo durante los ensayos de biorremediación permitiendo optimizar su aplicación y mejorar la calidad del proceso.
4. En esta tesis, se detectaron y cuantificaron grupos filogenéticos poco explorados en ecosistemas terrestres como *Acidobacterias*, *Planctomycetes* y *Archaea*. Estudios moleculares sobre estos grupos microbianos específicos contribuirían a comprender la importancia ecológica de estos organismos como miembro metabólicamente activos de las comunidades microbianas de suelos agrícolas contaminados con simazina.
5. El estudio iniciado en esta tesis en relación a la diversidad y estructura de las comunidades microbianas puede ser complementado con la aplicación otras herramientas moleculares (MAR-FISH; análisis funcional de genes catabólicos mediante mRNA, etc.) que permitirán conocer la función principal que desempeña cada uno de los miembros activos en la comunidad del suelo y específicamente en relación al catabolismo de s-triazinas.

REFERENCIAS

X. REFERENCIAS

- Agrícola Nacional S.A.C. e I. (ANASAC). 2007. Recomendaciones de uso: simazina. ANASAC. Santiago, Chile. Disponible en: <http://www.anasac.cl>
- Agulló, L., B. Cámara, P. Martínez, V. Latorre-Reyes, y M. Seeger. 2007. Response to (chloro)biphenyls of the PCB-degrader *Burkholderia xenovorans* LB400 involves stress proteins induced also by heat shock and oxidative stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 267: 167-175
- Ahmed, F.E. 2001. Analysis of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *Trends Anal. Chem.* 20: 649-661.
- Alexander, M. 1999. Biodegradation and bioremediation. 2nd edition, 480 pp. Academic Press, San Diego, CA.
- Alister C., R. López, y M. Kogan. 2005. Simazine dynamics in a vineyard soil at Casablanca valley, Chile. *Pest Manage. Sci.* 61: 1083-1088.
- Alvey S. y D.E. Crowley. 1996. Survival and activity of an atrazine-mineralizing bacterial consortium in rhizosphere soil. *Env. Sci. Technol.* 30:1596-1603.
- Amann R., W. Ludwig, y K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microb. Rev.* 59: 143-169.
- Andreoni V., G. Baggi, M. Colombo, L. Cavalca, M. Zangrossi y S. Bernasconi. 1998. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by a specialised organism and by indigenous soil microflora: bioaugmentation and self-mediability for soil restoration. *Lett Appl. Microbiol.* 27: 86-92.
- Assaf, N.A. y R.F. Turco 1994. Accelerated biodegradation of atrazine by a microbial consortium is possible in culture and soil. *Biodegradation.* 5: 29-35.
- Atlas, R.M. y R. Bartha. 1997. Microbial Ecology, fundamentals and applications. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood City, CA.

- Atlas, R.M. y R. Unterman. 1999. Bioremediation. En: Demain A. L. y Davies J. E. (Eds) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2nd ed, pp 666-681. ASM Press, Washington D.C.
- Barr, D.B. y L.L. Needham. 2002. Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review. J. Chromatogr. B. 778:1-2, 5-29.
- Barriuso, E. 2000. Contaminaciones con pesticidas utilizados en agricultura: el comportamiento de los pesticidas en el suelo como base para la interpretación y la previsión de los riesgos de contaminación. Workshop Internacional sobre Contaminación de suelos y aguas por agroquímicos. XVII Congreso Argentino Ciencia del Suelo, Mar del Plata, 11-14/4/00.
- Beaudet, R., M. J. Levesque, R. Villemur, M. Lanthier, M. Chenier, F. Lepine y J. G. Bisailon. 1998. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a contaminated soil inoculated with a methanogenic consortium or with *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50:135-141.
- Berrada H., G. Font, y J.C. Montó. 2003. Determination of urea pesticide residues in vegetable, soil and water samples. Crit. Rev. Anal. Chem. 33: 19-41.
- Biradar D. P. y A. L. Rayburn. 1995. Chromosomal damage induced by herbicide contamination at concentrations observed in public water supplies. J. Environ. Qual. 24: 1222-1225.
- Birnbaum, L. y S. Fenton. 2003. Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors, Environ. Health Perspec. 111, 389-394.
- Boon, N., Goris J., De Vos P., Verstraete W. y Top E. M. 2000. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain. Appl. Environ. Microbiol. 66:2906-2913.
- Boon N., Top E., Verstraete W. y Siciliano S. 2003. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1511-1520.
- Boopathy R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. Bioresour. Technol. 74(1): 63-67.

- Boundy-Mills K. L., de Souza M. L., Mandelbaum R. T., Wackett L. P. y M. J. Sadowsky. 1997. The *atzB* gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 916-923.
- Bouquard C., Ouazzani J., Prome J. C., MichelBriand Y. y Plesiat P. 1997. Dechlorination of atrazine by a *Rhizobium* sp. isolate, *Appl Environ Microbiol* 63: 862-866.
- Bruce K.D., Hiorns W.D., Hobman W.D., Osborn A.M., Strike P. y D.A. Ritchie. 1992. Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3413-3416.
- Buckley D.H. y T.M. Schmidt. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environ Microbiol* 5: 441-452.
- Buckley D.H., Huangyutitham V., Nelson T. A., Rumberger A. y J. E. Thies. 2006. Diversity of *Planctomyces* in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4522-4531
- Cardinal, L.J. y M.K. Stenstrom. 1991. Enhanced biodegradation of polyaromatic hydrocarbons in the activated sludge process. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation.* 63:950-957.
- Caracciolo A., P. Grenni, R. Ciccoli, G. Di Landa y C. Creisini. 2005. Simazine biodegradation in soil: analysis of bacterial community structure by in situ hybridization. *Pest. Manag. Sci.* 61: 863-869.
- Cassidy M.B., Lee H., and J.T. Trevors. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *J. Ind. Microbiol.* 16: 79-101.
- Chain P., Denev V., Konstantinidis K., Vergez L., Agulló L., Latorre Reyes V., Hauser L., Córdova M., Gómez L., González M., Land M., Lao V., Larimer F., LiPuma J., Mahenthiralingam E., Malfatti S., Marx C., Parnell J., Ramette A., Richardson P., Seeger M., Smith D., Spilker T., Sul W-J., Tsoi T., Ulrico L., Zhulin I. y J. Tiedje. 2006. *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.7 M bp genome shaped for versatility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113: 15280-15287.

- Chen D., Chen J., Zhong W. y Z. Cheng. 2008. Degradation of methyl tert-butyl ether by gel immobilized *Methylibium petroleiphilum* PM1. *Bioresour. Technol.* 99: 4702-4708.
- Cheng G., N. Shapir, Sadowsky M. J. y L. P. Wackett. 2005. Allophanate hydrolase, not ureasa, functions in bacterial cyanuric acid metabolism. *Appl. Environ. Microbial.* 71: 4437-4445.
- CIREN-CORFO, (1993). Series de suelos del valle del río Aconcagua, Santiago, Chile.
- Clarke K.R. y R.N. Gorley. 2006. PRIMER v6: User Manual/Tutorial PRIMER-E. Plymouth. 182pp.
- Cogger C.G., Bristow P.R., Stark J.D., Getzin L.W. y Montgomery M. 1998. Transport and persistence of pesticides in alluvial soils: Simazine. *J. Environ. Qual.* 27: 543-550.
- Cook A.M. y Hütter R. 1981 s-Triazines as nitrogen-sources for bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 29:1135–1143
- Cook A.M. y Hütter, R. 1981. s-Triazines as Nitrogen source for bacteria, *J. Agric. Food Chem.* 29: 1135-1143
- Cook A.M., Grossembacher, H. y R. Hütter. 1984. Bacterial degradation of N-cyclopropilmelamine: The steps to ring cleavage. *Biochem. J.* 222: 315-320.
- Cook A.M. y Hütter R. 1984. Deethylsimazine: bacterial dechlorination. Deamination and complete degradation. *J. Agric. Food Chem.* 32: 581-585.
- Cook A.M., Beilstein P. Grossembacher H. y R. Hütter. 1985. Ring cleavage and degradative pathway of cyanuric acid in bacteria. *Biochem. J.* 231: 25-30.
- Cooman K., P. Debels, M. Gajardo, R. Urrutia y R. Barra. 2005. Use of *Daphnia* spp. for the ecotoxicological assessment of water quality in an agricultural watershed in South-Central Chile. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 191-200.
- Coscollá, R. Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales.1993. pp 167-168. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Cox L., Celis R., Hermosín M. C. y J Cornejo. 2000a. Natural soil colloids to retard simazine and 2,4-D leaching in soil. *J. Agric. Food Chem.* 48: 93-99.

- Curran, W.S. 1998. Persistence of herbicides in soil, *Agronomy Facts* 36, Penn State College of Agric. Sci., Univ. Park, PA. Documento electrónico disponible en: <http://cropsoil.psu.edu/extension/facts/agfact36.pdf>
- Daane L.L. y M.M. Häggblom. 1999. Earthworm egg capsules as vectors for the environmental introduction of biodegradative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2376-2381.
- Daims H., Brühl A., Amann R., Schleifer K.H. y M. Wagner. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22:434-444.
- Davis, J.B. 1956. Microbial decomposition of hydrocarbons. *Ind. Eng. Chem.* 48:1444-1448.
- de Souza M. L., Seffernick J., Martinez B., Sadowsky M. J. y L. P. Wackett. 1998. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *J. Bacteriol.* 180: 1951-1954.
- Dean J.R., Wade G., Barnabas I.J. 1996. Determination of triazine herbicides in environmental samples. *J. Chromatogr. A*, 733, 295-335.
- Debarati P., Pandey G., Meier C., van der Meer R. y J. Rakesh. 2006. Bacterial community structure of a pesticide-contaminated site and assessment of changes induced in community structure during bioremediation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57(1): 116-127.
- Dejonghe W., Goris J., Fantroussi S., Hofte M., De Vos P., Verstraete W. y Top, E. 2000. Effect of dissemination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation plasmids on 2,4-D degradation and on bacterial community structure in two different soil horizons. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3297 - 3304.
- Dejonghe W., Boon N., Seghers D., Top E. M. y W. Verstraete. 2001. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environ Microbiol* 3: 649-657.
- Devinny J. y S.H. Chang. 2000. Bioaugmentation for soil bioremediation. In: *Bioremediation of contaminated soils*, Wise D.L. y D.J. Trantolo (eds.). Marcel Dekker Inc., New York, p.465-488.

- Díaz, E. 2004. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol* 7: 173-180.
- Dinamarca A., Cereceda-Balic F., Fadic X. and Seeger M. 2007. Microbial simazine-degrading cells in soil: most-probable-number enumeration and tetrazolium salt detection in microtiter plates. *Int. Microbiol.* 10: 209-215.
- Engelen B., Meinken K., Von Wintzingerode F., Heuer H., Malkomes H. y H. Backhaus. 1998. Monitoring impact of pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2814-2821.
- Environmental Protection Agency (EPA). 2007. Maximum contaminant levels and regulatory dates for drinking water. U.S. EPA v/s California. Federal and State MCL's. California Department of Pesticide Regulation (CDPR). California, EEUU <http://www.dhs.ca.gov>
- EU 2004. 91/414/EEC-Council Directive 91/414/EEC of 10 March 2004 concerning the non-inclusion of simazine in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance. PAN Europe. Official J. L078, 16 March 2004, pp.50–52.
- Fan W., Yanase T., Morinaga H., Gondo S., Okabe T. y M. Nomura. 2007. Herbicide atrazine activates SF-1 by direct affinity and concomitant co-activators recruitments to induce aromatase expression via promoter II. *Biochem Biophys Res Commun.* 355: 1012-1018.
- Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act (FIFRA). 2000. Atrazine: hazard and dose-response assessment and characterization. FIFRA. Virginia, EEUU. Disponible en: <http://www.epa.gov>
- Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water. 2006. Guideline for Canadian drinking water quality. Canadian Council of Ministers of Environment (CCME). Winnipeg, Canadá. Disponible en: <http://www.ccme.ca>
- Flores C. 2007. Degradación bacteriana de herbicidas en microcosmos de suelo. Memoria de Ingeniero Civil Ambiental. UTFSM. Valparaíso, Chile.

- Flores C., Morgante V., González M., Navia R. y M. Seeger. Adsorption studies of the herbicide simazine in agricultural soils of Aconcagua valley, central Chile. *Chemosphere*. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.10.060. *In press*.
- Fournier J.C., Soulas G. y N.R. Parekh. 1997. Main Microbial Mechanisms of Pesticide Degradation in Solis. In, *Soil ecotoxicology*, p. 85-116. CRC Press, Boca Raton, FL.
- García-González V., Govantes F., Shaw L. J., Burns R. G. y E. Santero. 2003. Nitrogen control of atrazine utilization in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6987-6993.
- Garrido T., Costa C., Fraile J., Orejudo E., Niñerota J., Ginebreda A., Olivilla L. y M. Figueras. 1998. Análisis de la presencia de plaguicidas en diversos acuíferos de Cataluña. *Acta de Jornadas sobre la contaminación de las aguas subterráneas: un problema pendiente*. Asociación Internacional de Hidrogeólogos (AIH), 127-133. Valencia, España.
- Gebendinger N. y M. Radosevich. 1998. Inhibition of atrazine degradation by cyanazine and exogenous nitrogen in bacterial isolate M 91-3. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 375-381.
- Gentry, T.J., Newby, D.T., Josephson, K.L., y I.L. Pepper. 2001. Soil microbial population dynamics following bioaugmentation with a 3-chlorobenzoate-degrading bacterial culture. *Bioaugmentation effects on soil microorganisms*. *Biodegradation*. 12: 349-357.
- Gentry T.J., Rensing C. y I.L. Pepper. 2004. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 34: 447-494.
- Gil, P. 2006. Seminario: Manejo del riego y suelo en el cultivo del palto. Gobierno de Chile. Ministerio de Agricultura. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). El Centro Regional de Investigación (CRI) La Platina de Paltos. 18 p. Documento electrónico disponible en: http://www.avocadosource.com/Journals/INIA/INIA_Palta_GIL_PAPER.pdf
- Girvan M.S., Campbell C.D., Killham K., Prosser J.I. y L.A. Glover. 2005. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ. Microbiol.* 7: 301-313.
- Graymore M., Stagnitti F. y Allinson G. 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ. Int.* 26: 483-495.

- Grigg B.C., Assaf N.A. y R.F. Turco. 1997. Removal of atrazine contamination in soil and liquid systems using bioaugmentation. *Pesticide Sci.* 50:211-220.
- Gunasekara A., Troiano J., Goh K.S. y R.S. Tjeerdema. 2007. Chemistry and fate of simazine. Environmental Monitoring Branch, U.S. EPA Department of Pesticide Regulation. Sacramento, EEUU.
- Gupta V.K., Mittal, A. y Gajbe V., 2005. Adsorption and desorption studies of a water soluble dye, Quinoline Yellow, using waste materials. *J. Colloid Interf. Sci.* 284, 89-98.
- Gupta V.K., Mittal A., Krishnan L. y J. Mittal. 2006. Adsorption treatment and recovery of the hazardous dye, Brilliant Blue FCF, over bottom ash and de-oiled soya. *J. Colloid Interf. Sci.* 293, 16-26.
- Hang S., Barriuso E. y S. Houot. 2003. Behaviour of ¹⁴C-atrazine in Argentinean topsoils under different cropping managements. *J. Environ. Qual.* 32: 2216-2222.
- Hayatsu M., Hirano M. y S. Tokuda. 2000. Involvement of two plasmids in fenitrothion degradation by *Burkholderia* sp. strain NF100. *Appl Environ Microbiol.* 66(4):1737-40.
- Hayes T., Haston K., Tsui M., Hoang A., Haeffele C. y A. Vonk. 2003. Atrazine induced hermaphroditism at 0,1 ppb in American Leopard Frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environ. Health Perspect.* 111: 568-575.
- Hayes T., Case P., Chui S., Chung D., Haeffele C. y Haston K., 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact. *Environ. Health Perspec.* 1:40-50.
- Head I.M., Saunders J.R. y R.W. Pickup. 1998. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbiol. Ecol.* 35:1-21.
- Hernández M., Morgante V., Flores C., Villalobos P., González M., Miralles P., Dinamarca M.A. y M. Seeger. 2008a. Modern approaches for the study of bioremediation of s-triazine herbicides in agricultural soils. *J. Soil Sci. Plant Nut.* 8 (2): 19-30.

- Hernández M., Morgante V., Ávila M., Miralles P., González M. y M. Seeger. 2008b. Novel s-triazine-degrading bacteria isolated from agricultural soils of central Chile for herbicide bioremediation. *EJBiotech/RES/870*. In press.
- Hernández M., Villalobos P., Morgante V., González M., Reiff C., Moore E. and M. Seeger. 2008c. Isolation and characterization of a novel simazine-degrading bacterium from Chilean agricultural soils, *Pseudomonas* sp. MHP41. *FEMS Microbiol. Lett.* 286: 184-190.
- Hicks R., Amann R.I. y D.A. Stahl. 1992. Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom level 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2158-2163.
- Hugenholtz P., Tyson G.W. y L.L. Blackall. 2001. Design and evaluation of 16S RNA-targeted oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization. *Methods Mol. Biol.* 176:29-42.
- Insam, H. 2001. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma* 100: 389-402.
- Janssen P.H., Yates P.S., Grinton B.E., Taylor P.M., Sait M. 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(5):2391-2396.
- Janssen P.H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1719-1728.
- Jezequel K. y Lebeau T. 2008. Soil bioaugmentation by free and immobilized bacteria to reduce potentially phytoavailable cadmium. *Bioresour. Technol.* 99: 690-698.
- Juretschko S., Loy A., Lehner A. y Wagner M. 2002. The microbial community composition of a nitrifying–denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst. Appl. Microbiol.* 25: 84–99.

- Kent A.D., Smith D.J., Benson B.J. y E.W. Triplett. 2003. A web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6768-6776.
- Kim, M.K., Singleton, I., Yin, C.R., Quan, Z.X., Lee, M. and Lee, S.T. 2006. Influence of phenol on the biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *Pseudomonas putida* MK1. *Lett Appl Microbiol* 42, 495-500.
- Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H. y J.T. Trevors. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Meth.* 58: 169-188.
- Kluyver, A.J. y C. B. van Niel. 1956. *The Microbe's Contribution to Biology*, pp 3. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Kosanke G.J., Schiwippert W.W. y T.W. Beneke. 1988. The impairment of mobility and development in freshwater snails (*Physa fontinalis* and *Lymnaea stagnalis*) caused by herbicides. 1988. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 90: 373-379.
- Kotouckova L., Schumann P., Durnova E., Sproer C., Sedlacek I., Neca J., Zdrahal Z. y M. Nemeč 2004. *Arthrobacter nitroguajacolicus* sp. nov., a novel 4-nitroguaiacol-degrading actinobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 773-777.
- Kristensen G. B., Johannesen H. y J. Aamand. 2001. Mineralization of aged atrazine and mecoprop in soil and aquifer chalk. *Chemosphere.* 45: 927-934.
- Krutz L.J., Shaner D.L., Accienelli C., Zablutowicz R.M. y W.B. Henry. 2008. Atrazine dissipation in triazine-adapted and -nonadapted soil from Colorado and Mississippi: implications of enhanced degradation on atrazine fate and transport parameters. *J. Environ. Qual.* 37:848-857.
- Kumar P. y T. Satyanarayana. 2007. Economical glucoamylase production by alginate-immobilized *Thermomucor indicae-seudaticae* in cane molasses medium. *Lett. Appl. Microbiol.* 45(4):392-397.
- Labana S., Pandey G., Paul D., Sharma N. K., Basu A. y R.K. Jain. 2005. Pot and field studies on bioremediation of *p*-nitrophenol contaminated soil using *Arthrobacter protophormiae* RKJ100. *Environ. Sci. Technol.* 39: 3330-3337.

- Lagrega M.O., Buckingham P.L. y J.C. Evans. 1998. Método biológicos. En: Gestión de residuos tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos, pp: 711-735. McGraw Hill. México D.F., México.
- Lamar R.T., Davis M.W., Dietrich D.M. y J.A. Glaser. 1994. Treatment of a pentachlorophenol- and creosote- contaminated soil using the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordid*: A field demonstration. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1603-1611.
- Leys N., Ryngaert A, Bastiaens L, Verstraete E., Top E.M y W. Springael D. 2004. Occurrence and phylogenetic diversity of Sphingomonas in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1944-1955.
- Li F., Hullar M.A.J. y J.W. Lampe. 2007. Optimization of terminal restriction fragment polymorphism (TRFLP) analysis of human gut microbiota. *J Microbiol Meth* 68: 303-311.
- Liu W.T., Marsh T.L., Cheng H. y L.J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Env. Microbiol.* 63:4516-4522.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32: 1363-1371.
- Luzio W. y S Alacayaga. 1992. Mapa de Asociaciones de grandes grupos de suelos de Chile. *Agricultura Técnica.* N° 52, Santiago, Chile.
- Macrae A., Rimmer D.L. y O'Donnell A.G. 2000. Novel bacterial diversity recovered from the rhizosphere of oilseed rape (*Brassica napus*) determined by the analysis of 16S ribosomal DNA. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78: 13-21.
- Mandelbaum R.T., Allan D.L. y L. P. Wackett. 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Appl. Environ Microbiol.* 61: 1451-1457.
- Mandelbaum R.T., Wackett L.P. y D.L. Allan. 1993. Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1695-1701.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Vancanneyt M. y K.H. Schleifer. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the

phylum Cytophaga–Flavobacter–Bacteroides in the natural environment. *Microbiol.* 142:1097-1106.

- Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M. y K.H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: Problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15:593–600.

- Manzano M., Morán A.C., Tesser B., González B. 2007. Role of eukaryotic microbiota in soil survival and catabolic performance of the 2,4-D herbicide degrading bacteria *Cupriavidus necator* JMP134. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91: 115-126.

- Margesin R. y F. Schinner- 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in Alpine Glacier Skiing area. *Appl. Environm. Microbiol.* 67: 3127- 3133.

- Martinez B., Tomkins J., Wackett L.P., Wing R. y M.J. Sadowsky. 2001. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *J. Bacteriol.* 183: 5684-5697.

- Martínez P., Agulló L., Hernández M. y M. Seeger. 2007. Chlorobenzoate inhibits growth and induces stress proteins in the PCB-degrading bacterium *Burkholderia xenovorans* LB400. *Arch. Microbiol.* 188: 289-297.

- Martin-Laurent F., Barrés B., Wagschal I., Piutti S., Devers M., Soulas G. y L. Philippot. 2006. Impact of the maize rhizosphere on the genetic structure, the diversity and the atrazine-degrading gene composition of cultivable atrazine-degrading communities. *Plant and Soil.* 282: 99-115.

- Mertens B., Boon N. y W. Verstraete. 2006. Slow-release inoculation allows sustained biodegradation of gamma-hexachlorocyclohexane. *Appl Environ Microbiol.* 72: 622-627.

- Miralles 2007. Estrategias de bioaumentación para la biorremediación de herbicidas s-triazinas en suelo. Memoria de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Ambiental. UTFSM. Valparaíso, Chile.

- Mirgain I., Green G.A. y H. Monteil. 1993. Degradation of atrazine in laboratory microcosms: isolation and identification of the biodegrading bacteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 1627-1634.

- Mishra S., Jiot J., Kuhad R.C. y L. Banwari. 2001. Evaluation of Inoculum to Stimulate *in situ* bioremediation of oily sludge-contaminated soil. *Appl. Env Microbiol.* 67:1675-1681.
- Morán A.C., Müller A., Manzano M. y B. González. 2005. Simazine treatment history determines a significant herbicide degradation potential in soils that is not improved by bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. ADP. *J. Appl Microbiol.* 101:1-26.
- Muller A.K., Westergaard K., Christensen S. y S.J. Sorensen. 2001. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36:11-19
- Musat N., Wenera U., Knittela K., Kolba S., Dodenhofa T., van Beusekomb J., de Beera D., Dubiliera N. y R. Amann. 2006. Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Rømø Basin, Wadden Sea. *System. Applied. Microbiol.* 29: 333-348.
- Neef A., Amann R., Schlesner H. y K.H. Scheifer. 1998. Monitoring a widespread bacterial group: In situ detection of *Planctomyces* with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiol.* 144:3257-3266.
- Newcombe D.A. y D. E. Crowley. 1999. Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 877-882.
- Nogales B., Moore E. R., Abraham W. R. y Timmis K. N. 1999. Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil, *Environ Microbiol* 1: 199-212.
- Nogales B., Moore E.R., Llobet-Brossa E., Rossello-Mora R., Amann R. y K.N. Timmis. 2001. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl Environ Microbiol* 67: 1874-1884.
- Nogales B. 2005. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: Descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas* 14(2): 41-50.
- Novak, J.M., 1999. Soil factors influencing atrazine sorption: Implications on fate. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1663-1667.

- Observatorio Latinoamericano de Conflictos Ambiental (OLCA). 1998. Plaguicidas con solicitudes de prohibición y de severa restricción. OLCA. Santiago, Chile. Disponible en: <http://www.olca.cl>
- ODEPA y CIREN. 2004. Catastro frutícola Región Metropolitana, principales resultados. Oficina de estudios y planificación agraria (ODEPA) y Centro de Información y recursos naturales (CIREN). Documento electrónico disponible en: <http://www.odepa.cl>.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Statistical Database. FAO. Roma, Italia. Disponible en: <http://www.fao.org>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, (FAO). 2004. El Estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación 2003-2004. Producido por: Departamento Económico y Social. Roma.
- Ostrofsky E.B., Robinson J.B., Traina S.J. y O.H. Touvinen. 2002. Analysis of atrazine-degrading microbial communities in soils using most-probable-number enumeration, DNA hybridization, and inhibitors. *Soil Biol & Biochem.* 34: 1449-1459.
- Palleroni, N.J., y E.R. Moore. 2004. Taxonomy of Pseudomonads: experimental approaches. En: Ramos, J. L. (ed.), *Pseudomonas*, Vol. 1, pp. 3 - 44. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Parales R.E., Bruce N.C., Schmid A. y L.P. Wackett. 2002. Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis (B3). *Appl Environ Microbiol* 68: 4699-4709.
- Park J., Feng Y., Ji P., Voice T.C. y S.A. Boyd. 2003. Assessment of bioavailability of soil-sorbed atrazine. *Appl. Environ Microbiol.* 69, 3288-3298.
- Pedersen, K. 2000. Exploration of deep intraterrestrial life. *FEMS Microbiol. Lett.* 185: 9-16.
- Pepper I.L., Gentry T.J., Newby D.T., Roane T.M. y K.L. Josephson. 2002. The role of cell bioaugmentation and gene bioaugmentation in the remediation of co-contaminated soils. *Environ. Health Perspect. Suppl.* 6: 943-946.

- Pesticide Action Network Europe (PAN Europe). 2006. What substances are banned and authorized in the EU market? PAN Europe. Londres, Inglaterra. Disponible en: <http://www.paneurope.info>
- Philp J.M. y R.M. Atlas. 2005. Bioremediation of contaminated soils and aquifers. En: R. M. Atlas y J. Philp (ed.), Bioremediation: Applied microbial solutions for realworld environmental cleanup, pp: 138-220. ASM Press. Washington, EEUU.
- Philp J.C., Bamforth S.M., Singleton I. y R.M. Atlas. 2005. Environmental pollution and restoration: a role for bioremediation. In: Applied microbial solutions for real-world environmental cleanup. Atlas R.M., and Philp J. (eds). Pp: 1-48. Washington: ASM Press.
- Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B.M., Ludwig W., Peplies J. y Glockner F.O. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35: 7188-7196.
- Quaiser A., Ochsenreiter T., Lanz C., Schuster S., Treusch A., Eck J. y C. Schleper. 2003. *Acidobacteria* form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Molecular Microbiol.* 50:2, 563-575.
- Radosevich M., Traina S.J., Hao Y.L y O.H. Tuovinen. 1995. Degadation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 297-302.
- Radosevich M., Traina S.J. y O.H. Tuovinen. 1996. Biodegradation of atrazine in surface soils and subsurface sediments collected from an agricultural research farm. *Biodegradation.* 7(2):137-49.
- Radosevich M., Traina S.J. y O.H. Tuovinen. 1997. Atrazine mineralization in laboratory-aged soil microcosms inoculated with s-triazine-degrading bacteria. *J. Environ. Qual.* 26:206-214
- Raina V., Suar M., Singh A., Prakash O., Dadhwal M. y S. K. Gupta. 2008. Enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) in contaminated soils via inoculation with *Sphingobium indicum* B90A. *Biodegradation* 19: 27-40.
- Ralebitso T., Senior E. y H. van Verseveld. 2002. Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments. *Biodegradation* 13: 11-19.

- Regitano J.B., Koskinen W.C. y M.C. Sadowsky. 2006. Influence of soil aging on sorption and bioavailability of simazine. *J. Agric. Food Chem.* 54: 1373-1379.
- Rhine E.D., Fuhrmann J.J. y M. Radosevich. 2003. Microbial community response to atrazine exposure and nutrient availability: Linking degradation capacity to community structure. *Microb. Ecol.* 46:145-160.
- Rosselló-Mora R. y López-López, A. 2008. The least common denominator: species or operational taxonomic units? In *Accessing uncultivated microorganisms: from the environment to organisms and genomes and back*. Zengler, K. (ed). Washington, DC: ASM Press, pp 117-130.
- Rousseaux S., Hartmann A., y G. Soulas. 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., Hatmann A., Lagacheire B., Piutti S., Andreaux F. y G. Soulas. 2002. Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heintzii* Cit1, in four different soils: effects of different inoculum densities. *Chemosphere* 51: 596-576.
- Rousseaux S., Hartmann A., Lagacherie B., Piutti S., Andreaux F. y G. Soulas. 2003. Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heintzii* Cit1, in four different soils: effects of different inoculum densities, *Chemosphere* 51: 569-576.
- Sadowsky M.J., Tong Z., de Souza M. y L.P. Wackett. 1998. AtzC is a new member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. *J. Bacteriol.* 180:152-158.
- Sanborn M.D., Cole D., Abelson A. y E. Weir. 2002. Pesticides identifying and managing adverse environmental health effects. *Can. Med. Assoc. J.* 166: 1431-1435.
- Sánchez Martín M.J. y Sánchez Camazano M. 1984. Monografía. Instituto de recursos naturales y agrobiología (CSIC). Temas de divulgación, 1era. Ed. Disponible en: <http://www.ceresnet.com/ceresnet/esp/servicios/teleformacion/agroambiente>.
- Santiago-Mora R., Martin-Laurent F., de Prado R. y A.R. Franco. 2005. Degradation of simazine by microorganisms isolated from soils of Spanish olive fields. *Pest. Manag. Sci.* 61: 917-921.

- Schmidt K.S. y M.J. Gier. 1989. Dynamics of microbial populations in soil: indigenous microorganisms degrading 2,4-dichloro-phenol. *Microb. Ecol.* 18: 285-296.
- Schmidt K.S. y M.J. Gier. 1990. Coexisting bacterial populations responsible for multiphasic mineralization kinetics in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2692-2697.
- Schönduve P., Sara M. y A. Friedl. 1996. Influence of physiologically relevant parameters on biomass formation in a trickle-bed bioreactor used for waste gas cleaning. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 286-292.
- Seeger M., Timmis K.N. y B. Hofer. 1997. Bacterial pathways for degradation of polychlorinated biphenyls. *Marine Chemistry* 58: 327-333.
- Seeger M., Acevedo F., Saavedra M., Agulló L., 2006. Biorremediación de Policlorobifenilos: desde sus Bases Moleculares a sus Aplicaciones en el Ambiente. En *Biorremediación de Suelos Contaminados con Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs)*, R. Navia y M. Seeger (eds), Vol. 1, pp. 87-125. Editorial U. La Frontera, Temuco.
- Servicio Agrícola Ganadero (SAG). 2003. Listado de plaguicidas prohibidos y restringidos en Chile. Subdepartamento plaguicidas y fertilizantes. Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile. Disponible en: <http://www.sag.gob.cl>
- Servicio Agrícola Ganadero (SAG). 2004. Declaración de ventas de plaguicidas de uso agrícola. Subdepartamento plaguicidas y fertilizantes. Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile. Disponible en: <http://www.sag.gob.cl>
- Servicio Agrícola Ganadero (SAG). 2006. Base de datos nacional de importación de plaguicidas y fertilizantes. Subdepartamento plaguicidas y fertilizantes. Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile. Disponible en: <http://www.sag.gob.cl>
- Shapir N. y R.T. Mandelbaum. 1997. Atrazine degradation in subsurface soil by indigenous and introduced microorganisms. *J. Agr. Food. Chem.* 45:4481-4486.
- Shapir N., Mongodin E.F., Sadowsky M.J., Daugherty S.C., Nelson K.E. y L.P. Wackett. 2007. Evolution of catabolic pathways: genomic insights into microbial s-triazine metabolism. *J. Bacteriol.* 189: 674-682.

- Shimabukuro R., Swanson H. y Walsh W. 1970. Glutathione conjugation: atrazine detoxication mechanism in corn. *Plant Physiology* 46: 103-107
- Siciliano S.D., Germida J.J., Banks K. y C.W. Greer. 2003. Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 483-489.
- Silva E., Fialho A., Sá-Correia I., Burns R. y A. Shaw. 2004. Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine. *Environ. Sci. Technol.* 38: 632-637.
- Singer A.C., Gilbert E.S., Luerpromchai E. y D.E. Crowley. 2000. Bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil using carvone and surfactant-grown bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 54: 838-845.
- Sørensen J. y O. Nybroe. 2004. *Pseudomonas* in the Soil Environment. En: Ramos J.L. (Ed), *Pseudomonas - Genomics, life style and molecular architecture*, Vol. 1, pp. 369-401. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Soulas G. y B. Lagacherie. 2001. Modelling of microbial degradation of pesticides in soils. *Biology and Fertility of Soils.* 33:551-557.
- Springael D. y E.M. Top. 2004. Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends in Microbiology* 12: 53-58.
- Stahl D.A. y R. Amann. 1991. Development and application of nucleic acid probes. En: Stackebrandt E. y M. Goodfellow (eds.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. pp. 205-248. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Stoesser G., Baker W., van den Broek A., Camon E., Garcia-Pastor M., Kanz C., Kulikova T., Leinonen R., Lin Q., Lombard V., Lopez R., Redaschi N., Stoehr P., Tuli M., Tzouvara K. y R. Vaughan. 2002. The EMBL Nucleotide Sequence Database *Nucleic Acids Research.* 30:21-26.
- Straube W.L., Jones M.J., Pritchard P.H. y W.R. Jones. 1999. Bench-scale optimization of bioaugmentation strategies for treatment of soils contaminated with high molecular weight polyaromatic hydrocarbons. *Res.Cons Recycl.* 27:27-37.

- Strong L.C., Mc Tavish H., Sadowsky M.J. y L.P. Wackett. 2000. Field-scale remediation of atrazine-contaminated soil usinr recombinant *Escherichia coli* expressing atrazine chlorohydrolase. *Environ. Microbiol.* 2:91-98.
- Strong L.C., Rosendhal C., Johnson G., Sadowsky M.J. y L.P. Wackett. 2002. *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazines ring compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5973-5980.
- Struthers J.K., Jayachandran K. y T.B. Moorman. 1998. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3368-3375.
- Tchelet R., Mecjenstock R., Steinle P. y J. R.Van der Meer. 1999. Population dynamics of an introduced bacterium degrading chlorinated benzenes in a soil column and in sewage sludge. *Biodegradation.* 10:113-125.
- Thompson J.R., Marcelino L.A. y Polz M.F. 2002. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Res.* 30:2083-2088.
- Top E.M. y D. Springael. 2003. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 262-269.
- Topp E., Mulbry W.M., Zhu H., Nour S.M. y D. Cuppels. 2000a. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardiodes* sp. isolates from agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3134-3141.
- Topp E., Zhu H., Nour S.M., Houot S., Lewis M. y D. Cuppels. 2000b. Characterization of an atrazine degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2773-2782.
- Topp, E. 2001. A comparison of three atrazine-degrading bacteria for soil bioremediation. *Biology and Fertility of Soils.* 33: 529-534.
- Torsvik V., Goksoyr J. y F.L. Daae. 1990. High diversity of DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:782-787.

- Torsvik V., Ovreas L. y T.F. Thingstad. 2003. Prokaryotic Diversity - Magnitude, Dynamics and Controlling Factors. *Science*. 296:1064-1066.
- Troiano J. 2002. Distribution of triazine residues in wells in relation to current and proposed maximum contaminant levels (MCLs). U.S. EPA Department of Pesticide Regulation. California, EEUU.
- Truper, H.G. 1992. Prokariotes- an overview with respect to biodiversity and environmental importance. *Biodiv.Cons.* 1:227-236.
- Vancov T., Jury K. y L. Van Zwieten. 2005. Atrazine degradation by encapsulated *Rhodococcus erythropolis* NI86/21. *J. Appl. Microbiol.* 99: 767-775.
- Vancov T., Jury K., Rice N., Van Zwieten L. y S. Morris. 2007. Enhancing cell survival of atrazine degrading *Rhodococcus erythropolis* NI86/21 cells encapsulated in alginate beads. *J Appl Microbiol* 102: 212-220.
- Vanderheyden V., Debongnie P. y Puissemier L. 1997. Accelerated degradation and mineralization of atrazine in surface and subsurface soil materials. *Pestic. Sci.* 49: 237-242.
- Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* 73: 1163-2001.
- Vogel T. M. 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology* 7:311-316.
- Vogel T.M. y M.V. Walter. 2002. Bioaugmentation. En: *Manual of Environmental Microbiology*. C.J. Hurst, R.L. Crawford, G.R. Knudsen, McInerney M.J. y L.D. Stetzenbach (eds), pp: 952-957. Segunda Edición. ASM Press. Washington, EEUU.
- Wackett L. y C.D. Hershberger. 2001. *Biocatalysis and biodegradation*. Cuarta edición, pp. 228. AMS Press, Washington, EEUU.
- Wackett L., Sadowsky M.J., Martinez B. y N. Shapir. 2002. Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzyme to field studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 39-45.

- Wackett L.P. 2003. *Pseudomonas putida* - a versatile biocatalyst. *Nature Biotech.* 21: 136-138.
- Wang M., Ahrné S. y G. Molín. 2004. T-RFLP combined with principal component analysis and 16S rRNA gene sequencing: an effective strategy for comparison of fecal microbiota in infants of different ages. *J. Microbiol Methods.* 59: 53-69.
- Watanabe K., Futamata H. y S. Harayama. 2002. Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategies, *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 655-663.
- Whitman W.B., Coleman D.C. y W.J. Wiebe. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 6578-6583.
- Yanze-Kontchou C. y N. Gschwind. 1994. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4297-4302.
- Ying G.G., Kookana R.S. y M. Mallavarpu. 2005. Release behavior of triazine residues in stabilised contaminated soils. *Environ. Pollut.* 134: 71-77.
- Zaballos M., López-López A., Ovreas L., Bartual S.G., D'Auria G. y J.C. Alba. 2006. Comparison of prokaryotic diversity at offshore oceanic locations reveals a different microbiota in the Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56: 389-405.
- Zarda B., Hahn D., Chatzinotas A., Schönhuber W., Neef A., Amann R. y J. Zeyer. 1997. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization. *Arch. Microbiol.* 168: 185-192.
- Zobell C.E. 1946. Action of microorganisms in hydrocarbons. *Bact. Rev.* 10:1-49.

ANEXOS

ANEXO I

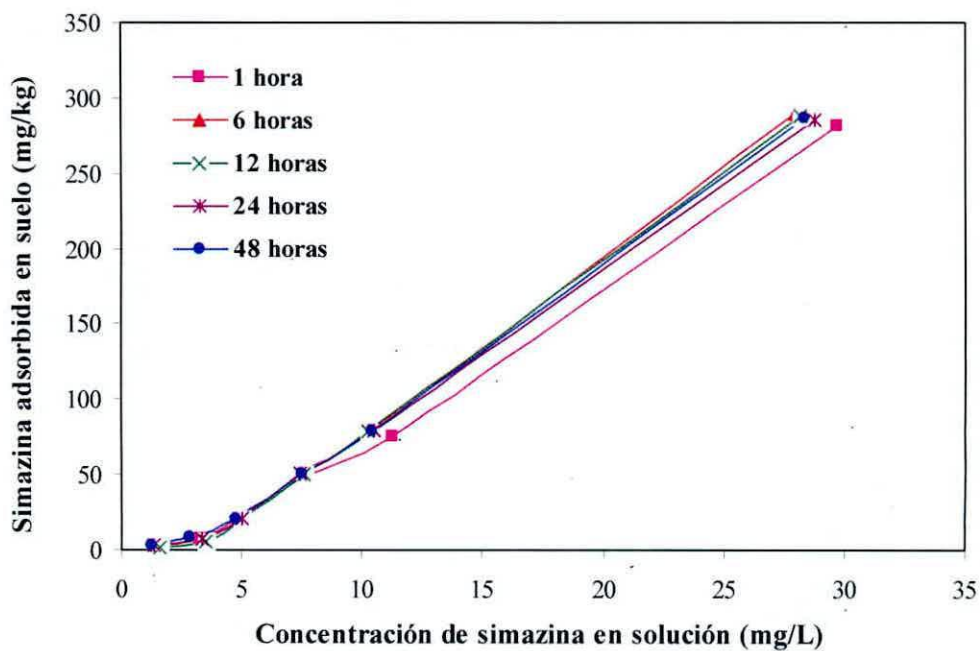
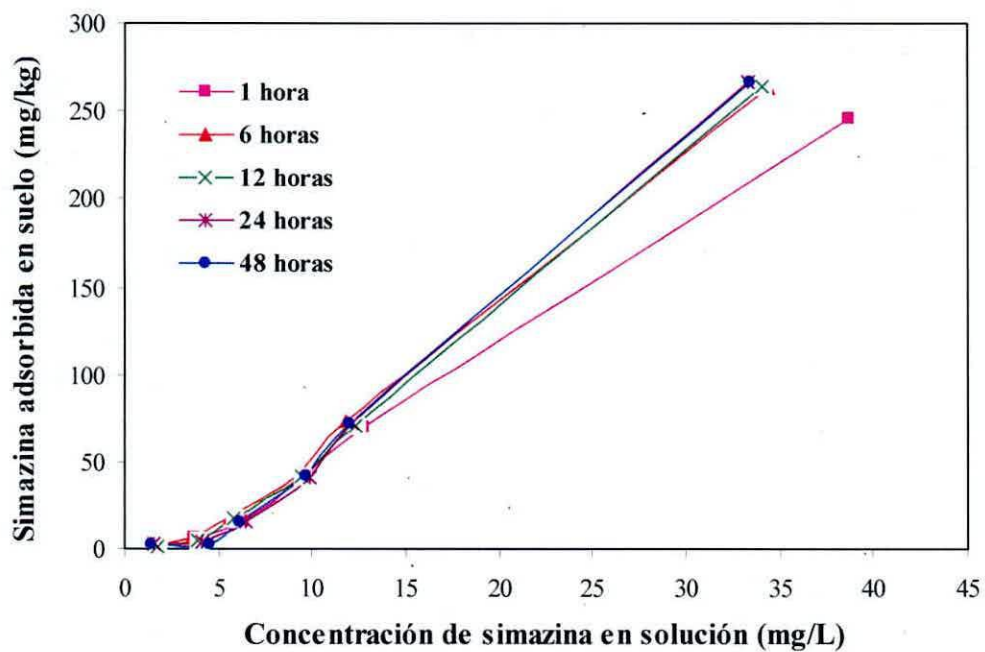


Figura A1. Isothermas de adsorción para simazina en suelos agrícolas a las 1, 6, 12, 24 y 48 horas. A) Suelo sin historial de aplicación de herbicida. B) Suelo con historial de aplicación de herbicida.

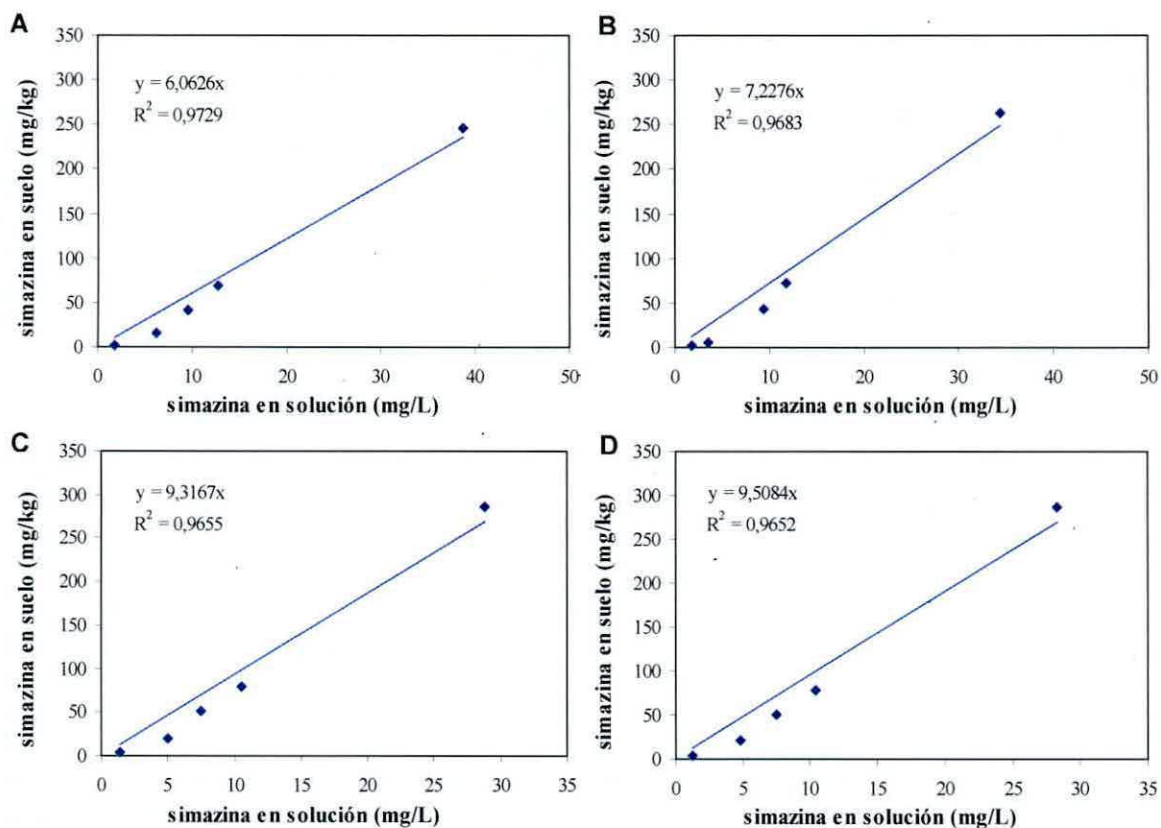


Figura A2. Ejemplificación de las regresiones lineales realizadas para obtener los coeficientes de distribución de simazina en suelo según el ajuste del modelo lineal. A) Suelo A, 24 horas, B) Suelo A, 48 horas, C) Suelo B, 1 hora, D) Suelo B, 6 horas.

Tabla A1. Coeficientes de distribución K_d para simazina en suelos agrícolas. Los ajustes se realizaron según el modelo lineal para ambos suelos estudiados.

Tiempo (horas)	Suelo A		Suelo B	
	K_d ($L\ kg^{-1}$)	r^2	K_d ($L\ kg^{-1}$)	r^2
1	6,06	0,97	8,89	0,96
6	7,23	0,97	9,64	0,96
12	7,29	0,97	9,54	0,96
24	7,74	0,98	9,32	0,97
48	7,49	0,97	9,51	0,97

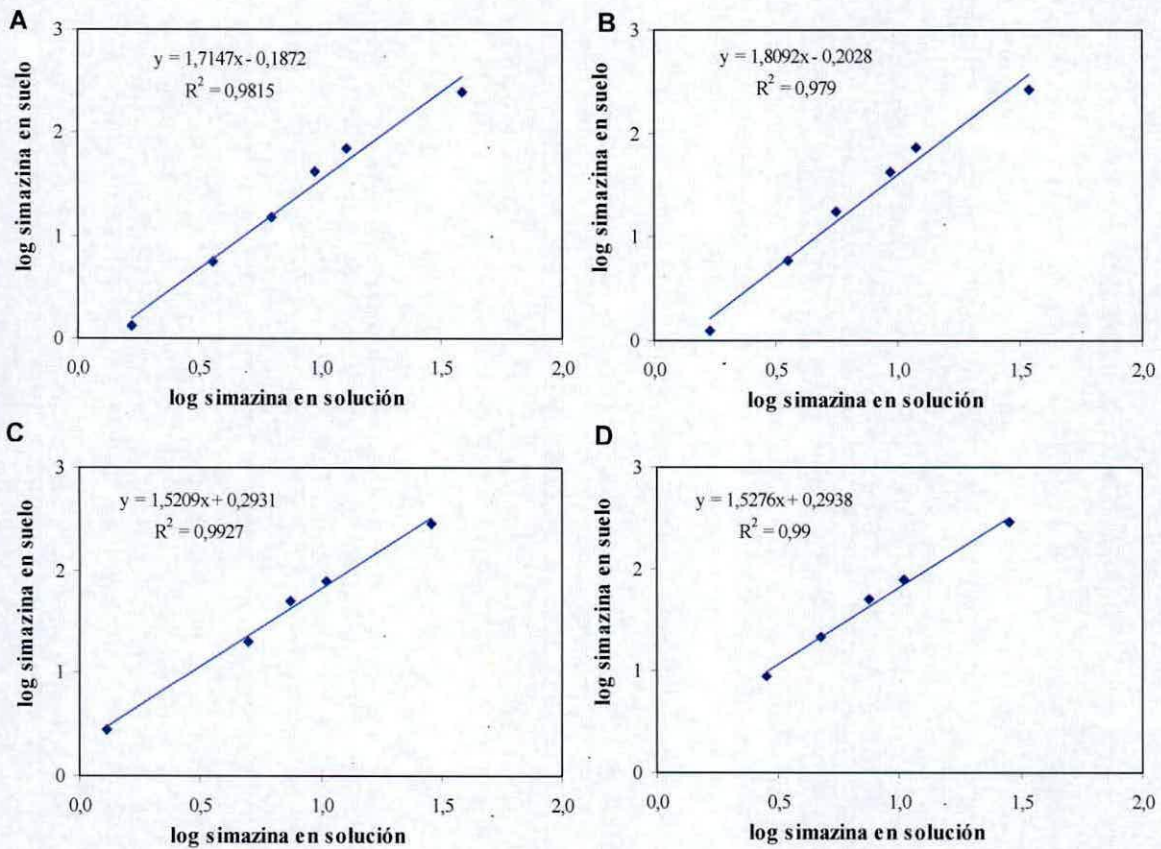


Figura A3. Ejemplificación de las regresiones lineales realizadas para obtener los coeficientes de distribución de simazina en suelo, según el ajuste del modelo de Freundlich. A) Suelo A, 24 horas, B) Suelo A, 48 horas, C) Isotherma suelo B, 1 hora, D) Isotherma suelo B, 6 horas.

Tabla A2. Coeficiente de distribución (K_f), valores de n y r^2 para simazina en suelos agrícolas. Los ajustes se realizaron según el modelo de Freundlich para ambos suelos estudiados.

Tiempo (horas)	Suelo A			Suelo B		
	K_f (L kg ⁻¹)	n	r^2	K_f (L kg ⁻¹)	n	r^2
1	1,54	0,58	0,98	2,37	0,70	0,99
6	1,60	0,55	0,98	1,78	0,64	0,99
12	1,33	0,66	0,99	2,11	0,67	0,99
24	1,63	0,68	1,00	1,96	0,66	0,99
48	1,49	0,67	0,98	1,97	0,65	0,99

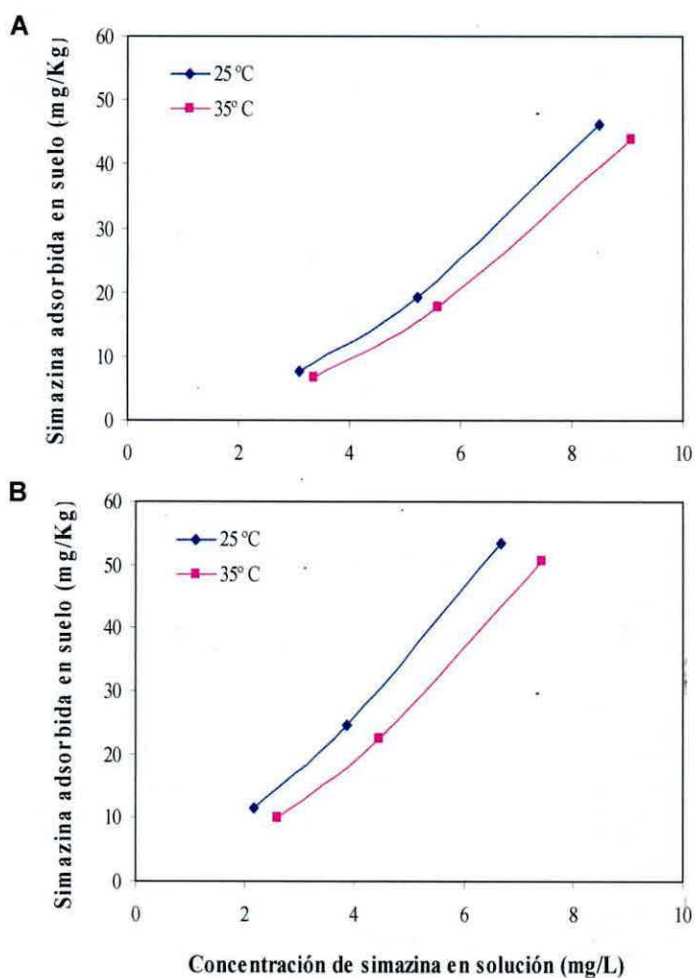


Figura A4. Isotermas de adsorción para suelos agrícolas a 25 y 35 ° C. Las isotermas se realizaron a diferentes temperaturas para el cálculo de entalpía de adsorción para el suelo A (A) y el suelo B (B).

Tabla A3. Valores de los parámetros del modelo de Langmuir requeridos para el cálculo de la entalpía de adsorción de simazina en suelo agrícola.

Temperatura (°C)	Suelo A			Suelo B		
	Q ₀ (mg kg ⁻¹)	b (L mg ⁻¹)	r ²	Q ₀ (mg kg ⁻¹)	b (L mg ⁻¹)	r ²
25	22.03	0,08	0,99	68,03	0,07	0,99
35	16.75	0,1	0,99	37,45	0,09	0,99

ANEXO II

Publicaciones internacionales

Los resultados obtenidos en esta tesis contribuyeron a las siguientes publicaciones científicas:

- Hernández, M., P. Villalobos, V. Morgante, M. González, C. Reiff, E. Moore and M. Seeger. (2008) Isolation and characterization of a novel simazine-degrading bacterium from Chilean agricultural soils, *Pseudomonas* sp. MHP41. *FEMS Microbiol Lett.* 286: 184-190.
- Flores, C., V. Morgante, M. González, R. Navia, and M. Seeger. Adsorption studies of the herbicide simazine in agricultural soils of Aconcagua valley, central Chile. *Chemosphere.* DOI:10.1016/j.chemosphere.2008.10.060.
- Hernández, M., V. Morgante, C. Flores, P. Villalobos, M. González, P. Miralles, M. A. Dinamarca and M. Seeger. (2008). Modern approaches for the study of bioremediation of s-triazine herbicides in agricultural soils. *J. Soil Sci. Plant Nut.* 8 (2): 19-30.
- Hernández, M., V. Morgante, M. Ávila, P. Miralles, M. González, and M. Seeger. (2008). Novel s-triazine-degrading bacteria isolated from agricultural soils of central Chile for herbicide bioremediation. *EJBiotech/RES/870.* Vol. 11(5).

Publicaciones en preparación

- Estos resultados contribuyen a la siguiente publicación científica: Morgante V., López-López A., Flores C., González M., González, B., Vásquez M., Rosselló-Mora R. and M. Seeger. 2008. Microbial community structure in simazine-treated soils and changes induced during bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. strain MHP41.
- Estos resultados contribuyen a la siguiente publicación científica: Morgante V., Miralles P., Flores C., González M., Vásquez M., and Seeger M. 2008. Biodegradation of simazine in contaminated soil and use of *Pseudomonas* sp. strain MHP41 in bioremediation approaches. *En preparación*

Patentes de invención

- Solicitud Patente de Invención 1982/2007 presentada en DPI, Ministerio de Economía, Chile, Julio 2007. "Bacteria degradadora de herbicidas del tipo s-triazinas, un producto de biorremediación y un método de aplicación".
- Solicitud Patente de Invención Internacional (Estados Unidos, Canadá, Colombia y Argentina Julio 2008). "s-Triazine herbicide-degrading bacteria, product for the bioremediation and method of bioremediation".

INVENTORES: Verónica Morgante, Marcela Hernández, Patricio Villalobos, Cecilia Flores, Myriam González y Michael Seeger.

ANEXO III

Asistencia a eventos científicos

Los resultados obtenidos en esta tesis fueron presentados en los siguientes eventos científicos:

Congresos Internacionales

- Bioremediation studies for the clean-up of chlorinated herbicide-treated agricultural soils. V. Morgante, P. Miralles, M. Hernández, C. Flores, M. González, and M. Seeger. **V International symposium of interactions of soil minerals with organic components and microorganisms**. Pucón, Chile. 24 - 29 de Noviembre de 2008.
- Characterization of *Pseudomonas nitroreducens* MHP41 and its application in bioremediation (enviado). Hernández M., Morgante V., Miralles P., González M., Rosselló-Mora R. and M. Seeger. **III International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering**. Palma de Mallorca, España. 21 - 25 de Septiembre de 2008.
- Bacterial community changes of a pesticide-contaminated soil during bioaugmentation. V. Morgante, A. López-López, R. Rosselló-Mora, R. De La Iglesia, M. González, M. Vázquez, and Seeger, M. **12º Simposio Internacional de Ecología Microbiana (12-ISME)**. Cairns, Australia. 17 - 22 de Agosto de 2008.
- Molecular characterization and phylogeny of *Pseudomonas nitroreducens* MHP41 isolated from Chilean agricultural soil. M. Hernández, V. Morgante, E. Moore, and M. Seeger. **12º Simposio Internacional de Ecología Microbiana (12-ISME)**. Cairns, Australia. 17 - 22 de Agosto de 2008.
- Biotecnología y desarrollo sustentable: microorganismos para la biorremediación ambiental. Seeger M., Agulló L., Morgante V., Hernández M., González M., Yañez C., Miralles P. y Rojas L. **I encuentro Internacional de Biotecnología y I Feria de**

Exhibición Biotecnológica. Medellín, Colombia, 10 - 14 de Marzo de 2008.
Comunicación ORAL.

- Estudio de las comunidades bacterianas de suelos tratados con el herbicida simazina durante estrategias de biorremediación con una bacteria nativa. Morgante V. Flores C., González M., De la Iglesia R., Vázquez M., González, B., Rosselló-Mora R. y Seeger M. **XI Congreso Argentino de Microbiología.** Córdoba, Argentina. 10 - 12 de Octubre de 2007. Comunicación ORAL
- Estrategias de bioaumentación de suelos agrícolas tratados con el herbicida simazina. Miralles P., Morgante V., González M., Flores C. y Seeger, M. **XI Congreso Argentino de Microbiología.** Córdoba, Argentina. 10 - 12 de Octubre de 2007.
- Microbial degradation of chlorinated herbicides in agricultural soil. Morgante V., Flores C., Miralles P., González M., Vázquez M., Rosselló-Mora R. and M. Seeger. **9th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology (BAGECO).** Alemania, Junio 2007. Comunicación ORAL.
- Biotecnología aplicada para la biorremediación de herbicidas en suelos agrícolas de Chile. Morgante V., Flores C., Miralles P., González M., y Seeger M. **VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe sobre Biotecnología Agropecuaria (REDBIO2007).** Viña del Mar, Chile. 22 - 26 de Octubre de 2007.
- Modern approaches for de study of bioremediation of herbicides in agricultural soil. Hernández M., Morgante V., Flores C., Villalobos P., González M., Miralles P., Dinamarca A. y Seeger M. **II Simposio internacional del suelo, Ecología y Medio Ambiente.** Temuco, Chile. Noviembre de 2007.
- Increase of microbial s-triazine metabolic activities by bioaugmentation with native bacteria. V. Morgante, M. González, M. Vázquez and M. Seeger. **11th International Symposium on Microbial Ecology (ISME).** Viena, Austria. 20 - 25 de Agosto de 2006.
- Efecto de la bioaumentación sobre la degradación de herbicidas y las comunidades microbianas en suelos agrícolas. Morgante V., Flores C., González M., Vázquez M., Rosselló-Mora R and M. Seeger. **XVIII Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM).** Pucón, Chile. 23 - 26 de Octubre de 2006.

- Simazine bioremediation using native soil bacteria. Morgante V., Flores C., González M., Vásquez M. and Seeger M. **X Congress of the Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB)**. Pinamar, Argentina. 3 - 6 de Diciembre, 2005.
- Bioaugmentation using *Pseudomonas* sp. strain P41 and natural attenuation of simazine-treated soils on an agricultural field. M. Seeger, V. Morgante, X. Fadic, F. Cereceda and M. Vásquez. Meeting of the International Union of Microbiological Societies (IUMS): **XI International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology**. San Francisco, California, USA. 24 - 28 de Julio de 2005.

Congresos Nacionales

- Estudios de mineralización de s-triazinas en suelo agrícola con la bacteria nativa *Pseudomonas nitroreducens* MHP41. Miralles P., Morgante V., González M., Flores C. y Seeger, M. 2007. **XXIX Congreso Chileno de Microbiología**. Viña del Mar, Chile. Diciembre 2007.
- Aplicación de la bacteria nativa *Pseudomonas nitroreducens* P41 para la biorremediación de herbicida s-triazina en suelos agrícolas. Miralles P., Morgante V., González M., Flores C. y Seeger, M. 2007. **X Congreso Estudiantes de Ciencias Ambientales de Educación Superior (CECADES)**. Coquimbo, Octubre 2007. Comunicación ORAL.
- Microbiología y Biotecnología Ambiental: Estudio de la degradación bacteriana de herbicidas y su aplicación para estrategias de biorremediación. Morgante V., Flores C., Miralles P., Hernández M., González M. y Seeger M. **IV Taller Nacional de Jóvenes Científicos de la Iniciativa Científica Milenio (ICM)**. Mantagua, Chile. 5 - 7 de Septiembre de 2007.
- Biodegradation of simazine in soils under natural conditions by addition of a native s-triazine degrading bacteria. Morgante V., Flores C., González M., Vásquez M. and Seeger M. **XXVII Congreso Chileno de Microbiología**. Pucón, Chile. 13-16 Octubre, 2005.

- Bioaugmentación de s-triazinas en suelos sin historial previo de aplicación de herbicidas. Flores C., Morgante V., González M., Vásquez M. and Seeger M. **XXVII Congreso Chileno de Microbiología**, Pucón, Chile. 13-16 Octubre, 2005.
- Degradation of simazine in agricultural soil: Bioaugmentation with the native *Pseudomonas* sp. strain P41 versus native microbiota. Morgante V., Fadic X., Cereceda F., Vásquez M. y Seeger M. **XXVI Congreso Chileno de Microbiología**. Valparaíso, Chile. 1- 3 de Diciembre de 2004.

ANEXO IV

Financiamiento

Esta tesis ha sido desarrollada en el marco de los siguientes proyectos y becas:

- Beca MECESUP-UCV-0206 y Fundación Andes
- Proyecto Iniciativa Científica Milenio: Núcleo Milenio EMBA P04/007-F y PCTB Red12
- Proyecto de la Unión Europea: ICA4-CT-2002-10011
- Proyectos: USM 130522, USM 130836 y USM CIDEP 70714
- Proyecto CORFO Apoyo a la Protección de Propiedad Industrial.

Becas y premios obtenidos durante esta tesis:

- ISME student travel grant: International Society of Microbial Ecology para la asistencia al "12th International Symposium on Microbial Ecology", realizado en la ciudad de Cairns, Australia, los días 17-22 Agosto de 2008.
- Financiamiento CONICYT para la asistencia al congreso "11th International Symposium on Microbial Ecology (ISME) realizado en la ciudad de Viena, Austria, los días 20-25 de Agosto de 2006.
- PABMB student travel grant: Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology para la asistencia al "X Congress of the Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology", realizado en la ciudad de Pinamar, Buenos Aires, Argentina, los días 3-6 Diciembre de 2005.
- Financiamiento para asistencia curso internacional, Proyecto EU-ICA4-CT-2002-10011 de la Comunidad Europea. El curso se realizó en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay, desde el 8 al 17 de noviembre de 2004.

- Beca MECESUP y Fundación Andes: adjudicado a estudiantes del Programa de Doctorado en Biotecnología UTFSM/PUCV para la realización de estadías cortas en el extranjero. Esta beca permitió financiar por un período de 4 meses una estadía de investigación en el Institut Mediterrani d'Estudis Avançats (IMEDA) de la Universidad de las Islas Baleares (CSIC-UIB), España, durante el año 2006.
- Financiamiento Núcleo Milenio EMBA P04/007-F, para una estadía de investigación de 3 meses de en el IMEDA, España, durante el año 2007.